

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 424**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2003 E 10012190 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2348119**

54 Título: **Vector multicistrónico lentivírico**

30 Prioridad:

01.02.2002 GB 0202403

31.05.2002 GB 0212768

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.09.2017

73 Titular/es:

OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)

Medawar Centre

Robert Robinson Avenue Oxford Science

Park Oxford, OX4 4GA, GB

72 Inventor/es:

RADCLIFFE, PHILIPPA;

MISKIN, JAMES E.;

WILKES, FRASER J. y

MITROPHANOUS, KYRIACOS A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 634 424 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vector multicistrónico lentivírico

5 La presente invención se refiere a un genoma de vector lentivírico, a un sistema de producción de vector lentivírico y a una partícula de vector lentivírico que comprende el genoma y particularmente, pero no exclusivamente, a su uso en terapia.

10 Los sistemas de vector retrovívico, tales como sistemas de vector lentivírico, se han propuesto como sistema de suministro para, entre otras cosas, la transferencia de un nucleótido de interés a uno o más sitios de interés. Es más, el concepto de uso de vectores víricos para terapia génica es bien conocido (Verma y Somia (1997) Nature 389: 239-242). Los genomas retrovívicos contienen genes accesorios, tales como un gen rev, un gen tat, un gen vif, un gen nef, un gen vpr o un gen S2. La delección de dichos genes accesorios, particularmente cuando se usan sistemas de vector retrovívico en terapia génica, es altamente ventajosa. En primer lugar, permite producir vectores sin los genes asociados normalmente con enfermedades en infecciones retrovívicas (por ejemplo, VIH). En segundo lugar, la delección de los genes accesorios permite empaquetar al vector más ADN heterólogo. En tercer lugar, pueden omitirse los genes cuya función es desconocida, tales como dUTPase y S2, reduciendo por tanto el riesgo de causar efectos indeseables. Se ha enseñado anteriormente por los inventores, por ejemplo en el documento WO 98/17815, cómo retirar muchos de los genes accesorios. Adicionalmente en el documento WO 99/45126, los inventores describen la optimización de codones de la secuencia gag-pol como medio para intentar superar el requisito de Rev/RRE para exportación y para potenciar la estabilidad del ARN. Sin embargo, sigue habiendo la necesidad de proporcionar estrategias para la provisión de vectores víricos útiles y seguros y de medios eficaces para su producción. La presente invención se enfrenta a estos problemas y de forma particularmente ventajosa se dirige a proporcionar un sistema más seguro en el que los genes accesorios víricos, tales como rev, no sean necesarios en la partícula de vector vírico que se usa en el tratamiento ni en su producción.

25 Kingsman SM, FDA/BRMA 25-26 de octubre de 2001, es un conjunto de diapositivas titulado "Safety Features In The Design, Manufacture and Clinical Monitoring of Lentivectors For The Treatment Of Parkinson's Disease, Prostate Cancer and AIDS".

30 Fuller M y Anson DS, Human Gene Therapy, 2001, 12: 2081-2093 se refieren a plásmidos auxiliares para la producción de vectores derivados de VIH-1.

35 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un genoma de vector multicistrónico derivable de un lentivirus para uso en un sistema de producción lentivírico independiente de rev para producir una partícula de vector derivada de lentivirus, comprendiendo dicho genoma una señal de empaquetamiento, un marco de lectura abierto (ORF) heterólogo en 3' de una LTR vírica y en 5' de un promotor, en el que el promotor controla la expresión de al menos un nucleótido de interés (NOI) en 3' útil en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo y en el que el ORF heterólogo está ligado operativamente con la LTR; en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen auxiliar rev está alterada de tal modo que dicho gen auxiliar es incapaz de codificar la proteína auxiliar funcional, o se retira del genoma del vector lentivírico, y en el que el elemento de respuesta a Rev (RRE) está alterado de tal modo que dicho RRE no es funcional, o se retira del genoma del vector lentivírico, y en el que el vector lentivírico es un vector lentivírico autoinactivante.

45 Por tanto, los inventores han encontrado ahora que es posible proporcionar un vector vírico que sea independiente de rev sin efecto perjudicial sobre el título vírico.

Preferiblemente, el genoma de vector es bicistrónico, tricistrónico o tetracistrónico.

50 En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico es un resto informador o un marcador seleccionable.

En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica un gen modulador.

55 Preferiblemente, el gen modulador se selecciona de represores de tetraciclina, tales como TetR, y transactivadores controlados por tetraciclina, tales como tTA y rtTA.

Preferiblemente, el represor de tetraciclina tiene optimización de codones para expresión en una célula de mamífero.

60 Preferiblemente, el represor de tetraciclina está ligado con una señal de localización nuclear.

En una realización preferida, el vector comprende más de un NOI en 3' del promotor interno o IRES.

Preferiblemente, el NOI da lugar a un efecto terapéutico.

65 En una realización, uno o más de los NOI están ligados operativamente con un operador de tetraciclina.

En otra realización, el vector comprende un represor de tetraciclina adicional en 3' del promotor interno.

Preferiblemente, el vector deriva de VIH-1, VIH-2, SIV, FIV, BLV, EIAV o lentivirus visna.

5 Preferiblemente, el vector deriva de un lentivirus no de primate.

Preferiblemente, el genoma de vector comprende una secuencia de cPPT.

10 Preferiblemente, el genoma de vector comprende un elemento regulador postranscripcional o un elemento traduccional.

Preferiblemente, los motivos ATG de la señal de empaquetamiento gag del genoma de vector lentivírico de tipo silvestre son motivos ATTG.

15 Preferiblemente, la distancia entre las regiones R del genoma de vector es sustancialmente la misma que en el vector lentivírico de tipo silvestre.

Preferiblemente, la región 3' U3 del genoma de vector incluye la secuencia de un promotor vírico y/o eucariótico.

20 Preferiblemente, la región 3' U3 del genoma de vector incluye un promotor vírico y/o eucariótico de tipo silvestre.

Preferiblemente, el promotor vírico es una región U3 de EIAV o MLV.

Por tanto, según la presente divulgación, se proporciona un vector lentivírico en el que el vector tiene lo siguiente:

25 los motivos ATG de la señal de empaquetamiento gag del vector lentivírico de tipo silvestre son motivos ATTG; la distancia entre las regiones R del vector lentivírico es sustancialmente la misma que en el vector lentivírico de tipo silvestre y la región 3' U3 del vector lentivírico incluye secuencias de un promotor vírico y/o eucariótico. Preferiblemente, la región 3' U3 puede incluir secuencias de la región U3 de EIAV o MLV, u otros promotores víricos o eucarióticos. En una realización, la región 3' U3 puede incluir promotores víricos o eucarióticos de tipo silvestre.

35 Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un sistema de producción de vector lentivírico para producir una partícula de vector derivado de lentivirus, comprendiendo dicho sistema un conjunto de secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes del genoma de vector, incluyendo el genoma de vector de la invención, proteínas Gag y Pol y la proteína Env o un sustituto funcional de las mismas, y en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen auxiliar rev está alterada de tal modo que dicho gen auxiliar es incapaz de codificar la proteína auxiliar funcional, o no está presente en el sistema de producción de vector lentivírico, y no se suministra en trans, y RRE está alterado de tal modo que RRE no es funcional, o no está presente en el sistema de producción de vector lentivírico, y no se suministra en trans.

40 Preferiblemente en el sistema, las secuencias de ácido nucleico que codifican al menos uno de los genes auxiliares vpr, vif, tat y nef, o genes auxiliares análogos, del lentivirus del que derivan dichas partículas, están alteradas también de tal modo que dichos genes auxiliares son incapaces de codificar las proteínas auxiliares funcionales, o se retiran del sistema.

45 Preferiblemente, el vector deriva de VIH-1, VIH-2, SIV, FIV, BLV, EIAV o lentivirus visna.

Preferiblemente, el vector deriva de un lentivirus no de primate.

50 Preferiblemente, el conjunto de secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes del vector incluye tres constructos de ADN que codifican el genoma de ARN del vector, las proteínas Gag y Pol y la proteína Env, o sustitutos funcionales de los mismos.

55 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un constructo de ADN para uso en el sistema de la presente invención, codificando dicho constructo de ADN un genoma de vector de ARN empaquetable según la invención.

60 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un conjunto de constructos de ADN para uso en el sistema de la invención que comprenden el constructo de ADN según la invención y un constructo de ADN que codifica las proteínas Gag y Pol o un sustituto funcional de las mismas.

Preferiblemente, el conjunto comprende adicionalmente un constructo de ADN que codifica la proteína Env o un sustituto funcional de la misma.

65 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar una partícula de vector lentivírico que comprende introducir un conjunto de secuencias de ácido nucleico o constructos de ADN de la

invención en una célula hospedadora y obtener la partícula de vector lentivírico, y una partícula de vector lentivírico producida por el sistema o proceso según la invención.

5 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula de vector derivado de lentivirus que comprende un genoma de ARN del vector, las proteínas Gag y Pol y la proteína Env o sustitutos funcionales de los mismos, en el que el genoma del vector es según la invención.

10 En otro aspecto, se proporciona una célula transducida con la partícula de vector lentivírico o constructo de ADN de la invención.

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector, el sistema, una partícula o una célula según la invención, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una partícula de vector lentivírico o constructo de ADN o célula de la invención para la preparación de un medicamento para suministrar un NOI a un sitio diana necesitado del mismo.

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema de suministro en forma de una partícula de vector lentivírico o constructo de ADN o célula de la invención para uso en medicina.

30 Preferiblemente, el vector lentivírico de la presente invención tiene un genoma vírico mínimo.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "genoma vírico mínimo" significa que el vector lentivírico se ha manipulado para retirar los elementos no esenciales y para retener los elementos esenciales para proporcionar la funcionalidad necesaria para infectar, transducir y suministrar una secuencia nucleotídica de interés a una célula hospedadora diana.

40 Los vectores lentivíricos de la invención incluirán vectores lentivíricos de primate tales como vectores de VIH (por ejemplo, vectores de VIH-1 y VIH-2) y vectores de SIV, y vectores lentivíricos no de primate. Los vectores lentivíricos de primate tienen una serie de desventajas que pueden limitar su aplicación terapéutica a ciertas enfermedades. Por ejemplo, el VIH-1 tiene la desventaja de ser un patógeno humano que porta potencialmente proteínas y secuencias oncogénicas. Existe el riesgo de que la introducción de partículas de vector producidas en células de empaquetamiento que expresan gag-pol de VIH introduzcan estas proteínas en un individuo, conduciendo a seroconversión. Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, el vector lentivírico será un vector lentivírico no de primate, tal como de EIAV, FIV, BIV, CAEV o MVV, prefiriéndose especialmente EIAV. Los vectores basados en lentivirus no de primates no introducen proteínas de VIH en los individuos.

45 Preferiblemente, el vector lentivírico es un vector de EIAV.

50 ASPECTOS DETALLADOS DE LA INVENCION

55 Se describirán ahora diversos rasgos y realizaciones preferidos de la presente invención a modo de ejemplo no limitante. Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente memoria son bien conocidas en la materia, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (1989) y a Ausubel et al., "Short Protocols in Molecular Biology" (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc (así como a la versión completa de Current Protocols in Molecular Biology).

Retrovirus y lentivirus

60 Como se menciona anteriormente, el concepto de uso de vectores víricos para terapia génica es bien conocido (Verma y Somia (1997) Nature 389: 239-242).

65 Existen muchos retrovirus. Para la presente solicitud, el término "retrovirus" incluye: virus de leucemia de murino (MLV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de tumor de mama de ratón (MMTV), virus de sarcoma de Rous (RSV), virus de sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de leucemia de murino Moloney (Mo-MLV), virus de osteosarcoma de murino FBR (FBR MSV), virus de sarcoma de murino Moloney (Mo-MSV), virus de leucemia de murino Abelson (A-MLV), virus de mielocitomatosis aviar 29 (MC29), virus de eritroblastosis aviar (AEV) y todos los demás retrovirus, incluyendo lentivirus.

70 Puede encontrarse una lista detallada de retrovirus en Coffin et al. ("Retroviruses", 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, pág. 758-763).

75 Los lentivirus pertenecen también a la familia de los retrovirus, pero pueden infectar tanto a células en división como no en división (Lewis et al. (1992) EMBO J. 3053-3058).

El grupo de lentivirus puede dividirse en “de primate” y “no de primate”. Los ejemplos de lentivirus de primate incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA), y el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). El grupo lentivírico no de primate incluye el prototipo de “virus lento” virus visna/maedi (VMV), así como el virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV) relacionado, el virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y los más recientemente descritos virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de inmunodeficiencia bovina (BIV).

Pueden encontrarse en la materia los detalles sobre la estructura genómica de algunos lentivirus. A modo de ejemplo, pueden encontrarse detalles sobre VIH y EIAV en la base de datos NCBI Genbank (concretamente, nº de acceso a genoma AF033819 y AF033820, respectivamente). Pueden encontrarse también detalles de las variantes de VIH en <http://hiv-web.lanl.gov>. Pueden encontrarse detalles de las variantes de EIAV en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Durante el proceso de infección, un retrovirus se enlaza inicialmente con un receptor de superficie celular específico. Con la entrada en la célula hospedadora sensible, el genoma de ARN retrovívico se copia entonces a ADN por la transcriptasa inversa codificada víricamente portada dentro del virus original. Se transporta este ADN al núcleo de la célula hospedadora, donde se integra posteriormente en el genoma del hospedador. En esta etapa, se hace referencia a él típicamente como provirus. El provirus es estable en el cromosoma hospedador durante la división celular y se transcribe como otros genes celulares. El provirus codifica las proteínas y demás factores requeridos para preparar más virus, que pueden dejar la célula mediante un proceso a veces llamado “gemación”.

Cada genoma retrovívico comprende los genes llamados gag, pol y env, que codifican proteínas y enzimas del virión. Estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración y transcripción províricas. Sirven también como secuencias potenciadoras-promotoras. En otras palabras, las LTR pueden controlar la expresión de los genes víricos. La encapsidación de ARN retrovíricos ocurre a causa de una secuencia psi localizada en el extremo 5' del genoma vírico.

Las LTR mismas son secuencias idénticas que pueden dividirse en tres elementos, que se llaman U3, R y U5. U3 deriva de la secuencia única del extremo 3' del ARN. R deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 deriva de la secuencia única del extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus.

Para el genoma vírico, el sitio de iniciación de la transcripción está en el límite entre U3 y R en la LTR del lado izquierdo y el sitio de adición de poli(A) (terminación) está en el límite entre R y U5 en la LTR del lado derecho. U3 contiene la mayoría de elementos de control transcripcional del provirus, que incluyen las secuencias promotora y potenciadoras múltiples sensibles a proteínas activadoras de la transcripción celular y en algunos casos vírica. Algunos retrovirus tienen uno cualquiera o más de los siguientes genes que codifican proteínas que están implicadas en la regulación de la expresión génica: tat, rev, tax y rex.

Con respecto a los genes estructurales gag, pol y env mismos, gag codifica la proteína estructural interna del virus. La proteína Gag se procesa proteolíticamente a las proteínas maduras MA (matriz), CA (cápsida) y NC (nucleocápsida). El gen pol codifica la transcriptasa inversa (RT), que contiene ADN polimerasa, ARNasa H asociada e integrasa (IN), que median la replicación del genoma. El gen env codifica la glucoproteína de superficie (SU) y la proteína transmembrana (TM) del virión, que forman un complejo que interacciona específicamente con proteínas receptoras celulares. Esta interacción conduce en última instancia a infección por fusión de la membrana vírica con la membrana celular.

Los retrovirus pueden contener también genes “adicionales” que codifican proteínas distintas de gag, pol y env. Los ejemplos de genes adicionales incluyen, en VIH, uno o más de vif, vpr, vpx, vpu, tat, rev y nef. EIAV tiene (entre otros) el gen adicional S2.

Las proteínas codificadas por los genes adicionales sirven para diversas funciones, alguna de las cuales puede ser el duplicado de una función proporcionada por una proteína celular. En EIAV, por ejemplo, tat actúa como activador transcripcional de la LTR vírica. Se une a una estructura secundaria de ARN de horquilla estable designada como TAR. Rev regula y coordina la expresión de genes víricos mediante elementos de respuesta a rev (RRE). Los mecanismos de acción de estas dos proteínas se cree que son ampliamente similares a los mecanismos análogos en los virus de primates. La función de S2 es desconocida. Además, se ha identificado una proteína de EIAV, Ttm, que está codificada por el primer exón de tat cortado y empalmado con la secuencia de codificación de env al inicio de la proteína transmembrana.

El vector lentivírico de la presente invención es un vector lentivírico recombinante.

Como se usa en la presente memoria, el término “vector lentivírico recombinante” (RLV) hace referencia a un vector con suficiente información genética para permitir el empaquetamiento de un genoma de ARN, en presencia de componentes de empaquetamiento, en una partícula vírica capaz de infectar y transducir una célula diana. La infección y transducción de una célula diana incluyen la transcripción inversa e integración en el genoma de la célula

diana. El RLV porta secuencias de codificación no víricas que se van a suministrar por el vector a la célula diana. Un RLV es incapaz de replicación independiente para producir partículas retrovíricas infecciosas en la célula diana final. Habitualmente, el RLV carece de un gen gag-pol y/o env funcional y/o de otros genes esenciales para la replicación. El vector de la presente invención puede configurarse como un vector de intrón escindido. Se describe un ejemplo de vector de intrón escindido en el documento WO 99/15683.

Preferiblemente, el vector lentivírico recombinante (RLV) de la presente invención tiene un genoma vírico mínimo.

Como se usa en la presente memoria, el término "genoma vírico mínimo" significa que el vector vírico se ha manipulado para retirar los elementos no esenciales y para retener los elementos esenciales para proporcionar la funcionalidad necesaria para infectar, transducir y suministrar una secuencia nucleotídica de interés a una célula diana hospedadora. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre esta estrategia en el documento de los inventores WO 98/17815.

Un genoma lentivírico mínimo para uso en la presente invención comprenderá por lo tanto (5') R-U5-una o más primeras secuencias nucleotídicas-(elemento regulador-NOI)_n-U3-R (3'). Sin embargo, el vector de plásmido usado para producir el genoma lentivírico en una célula hospedadora/célula de empaquetamiento incluirá también secuencias de control regulador transcripcional ligadas operativamente con el genoma lentivírico para dirigir la transcripción del genoma a una célula hospedadora/célula de empaquetamiento. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas a la secuencia retrovírica transcrita, concretamente, la región 5' U3, o pueden ser un promotor heterólogo tal como otro promotor vírico, por ejemplo el promotor de CMV. Algunos genomas lentivíricos requieren secuencias adicionales para una producción de virus eficaz. Por ejemplo, en el caso de VIH, se incluyen preferiblemente rev y la secuencia de RRE. Sin embargo, el requisito de rev y RRE se elimina en la presente invención. El requisito de rev y RRE se reduce adicionalmente o elimina mediante la optimización de codones. Pueden encontrarse detalles adicionales de esta estrategia en el documento de los inventores WO 01/79518.

El vector puede tener al menos uno de los siguientes: los motivos ATG de la señal de empaquetamiento gag del vector vírico de tipo silvestre son motivos ATTG; la distancia entre las regiones R del vector vírico es sustancialmente la misma que en el vector vírico de tipo silvestre, la región 3' U3 del vector vírico incluye la secuencia una región U3 de MLV y una secuencia nucleotídica ligada operativamente con la LTR vírica, en el que dicha secuencia nucleotídica está en 5' de un promotor interno y en el que dicha secuencia nucleotídica codifica preferiblemente un polipéptido o fragmento del mismo.

En una realización preferida, el sistema usado en la presente invención está basado en un sistema llamado "mínimo" en que se han retirado algunos o todos de los genes adicionales.

En la presente invención, el vector lentivírico es un vector autoinactivante. En otras palabras, el promotor vírico es una LTR autoinactivante.

A modo de ejemplo, se han construido vectores retrovíricos autoinactivantes eliminando los potenciadores transcripcionales o los potenciadores y promotores de la región U3 de la 3' LTR. Después de una ronda de transcripción inversa e integración de vector, se copian estos cambios en ambas 5' y 3' LTR, produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo (Yu et al. 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 3194-3198; Dougherty y Temin 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 1197-1201; Hawley et al. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 2406-2410; Yee et al. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 9564-9568). Sin embargo, cualquier promotor interno en las LTR de dichos vectores será transcripcionalmente activo. Esta estrategia se ha empleado para eliminar los efectos de potenciadores y promotores en las LTR víricas sobre la transcripción de genes dispuestos internamente. Dichos efectos incluyen una transcripción aumentada (Jolly et al. 1983 Nucleic Acids Res. 11: 1855-1872) o la supresión de la transcripción (Emerman y Temin 1984 Cell 39: 449-467). Esta estrategia puede usarse también para eliminar la transcripción en 3' de la 3' LTR a ADN genómico (Herman y Coffin 1987 Science 236: 845-848). Esta es una preocupación particular de la terapia génica, donde es de importancia crítica prevenir la activación accidental de un oncogén endógeno.

En una realización de la presente invención, el vector lentivírico deriva de un lentivirus no de primate. El lentivirus no de primate puede ser cualquier miembro de la familia de los lentivirus que no infecte naturalmente un primate, y puede incluir el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV), el virus Maedi-Visna (MVV) o el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Preferiblemente, el lentivirus es EIAV. El virus de la anemia infecciosa equina infecta todos los equinos, dando como resultado viremia plasmática y trombocitopenia (Clabough, et al. 1991. J. Virol. 65: 6242-51). Se cree que la replicación vírica está controlada por el proceso de maduración de monocitos a macrófagos.

El EIAV tiene la estructura genómica más sencilla de los lentivirus y se prefiere particularmente para uso en la presente invención. Además de los genes gag, pol y env, el EIAV codifica otros tres genes: tat, rev, y S2. Tat actúa como activador transcripcional de la LTR vírica (Derse y Newbold 1993 Virology, 194: 530-6; Maury, et al. 1994 Virology, 200: 632-42) y Rev regula y coordina la expresión de genes víricos mediante elementos de respuesta a rev (RRE) (Martarano et al. 1994 J. Virol. 68: 3102-11). Los mecanismos de acción de estas dos proteínas se cree que

son ampliamente similares a los mecanismos análogos en los virus de primate (Martano et al. *ibid*). La función de S2 es desconocida. Además, se ha identificado una proteína de EIAV, Ttm, que está codificada por el primer exón de tat cortado y empalmado con la secuencia de codificación de env al inicio de la proteína transmembrana.

5 En el documento de los inventores WO 99/32646, se dan detalles de los rasgos que pueden aplicarse ventajosamente a la presente invención. En particular, se apreciará que el genoma de lentivirus no de primate (1) preferiblemente comprende un gen gag eliminado en el que la delección de gag retira uno o más nucleótidos en 3' del nucleótido aproximadamente 350 o 354 de la secuencia de codificación de gag; (2) preferiblemente tiene uno o más genes accesorios ausentes del genoma de lentivirus no de primate; (3) preferiblemente carece del gen tat, pero
10 incluye la secuencia líder entre el extremo de 5' LTR y el ATG de gag y (4) combinaciones de (1), (2) y (3). En una realización particularmente preferida, el vector lentivírico comprende todos los rasgos (1) y (2) y (3).

También puede hacerse uso de un vector lentivírico, por ejemplo no de primate, en el que el vector tiene al menos uno de los siguientes: los motivos ATG de la señal de empaquetamiento gag del vector lentivírico de tipo silvestre son motivos ATTG; la distancia entre las regiones R del vector lentivírico es sustancialmente la misma que en el
15 vector lentivírico de tipo silvestre; la región 3' U3 del vector lentivírico incluye secuencias de una región U3 de MLV y una secuencia nucleotídica ligada operativamente con la LTR vírica, y en el que dicha secuencia nucleotídica está en 5' de un promotor interno y en el que dicha secuencia nucleotídica codifica preferiblemente un polipéptido o fragmento del mismo.

Se apreciará que la presente invención puede usarse para suministrar un nucleótido de interés (NOI) a una célula diana. En una realización preferida adicional del primer aspecto de la invención, se introducen más de un nucleótido de interés (NOI) en el vector en el sitio de clonación. En la presente invención, el NOI es útil en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

25

Sistemas de suministro

Se han propuesto sistemas de vector lentivírico como sistema de suministro para, entre otros, la transferencia de un NOI a uno o más sitios de interés. La transferencia puede ocurrir *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, o combinaciones de los
30 mismos. Incluso se han explotado sistemas de vector lentivírico para estudiar diversos aspectos del ciclo vital de los retrovirus, incluyendo el uso de receptor, transcripción inversa y empaquetamiento de ARN (revisado por Miller, 1992 *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 1-24).

Una partícula de vector lentivírico recombinante es capaz de transducir una célula receptora con un NOI. Una vez dentro de la célula, el genoma de ARN de la partícula de vector se transcribe inversamente a ADN y se integra en el ADN de la célula receptora.

Como se usa en la presente memoria, el término "genoma de vector" hace referencia tanto al constructo de ARN presente en la partícula de vector retrovírico como al constructo de ADN integrado. El término engloba también un constructo de ADN separado o aislado capaz de codificar dicho genoma de ARN. Un genoma lentivírico debería comprender al menos una parte componente derivable de un lentivirus. El término "derivable" se usa en su sentido normal, significando una secuencia nucleotídica o una parte de la misma que no tiene que obtenerse necesariamente a partir de un lentivirus, sino que en lugar de ello podría derivar del mismo. A modo de ejemplo, la secuencia puede prepararse sintéticamente o mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

45 El genoma de vector vírico es preferiblemente "defectivo de replicación", por lo que se entiende que el genoma no comprende suficiente información genética por sí solo para posibilitar una replicación independiente para producir partículas víricas infecciosas en la célula receptora. En una realización preferida, el genoma carece de un gen env, gag o pol funcional. En una realización altamente preferida, el genoma carece de los genes env, gag y pol.

50

El genoma de vector vírico puede comprender algunas repeticiones terminales largas (LTR).

La secuencia puede comprender también o actuar como una secuencia potenciadora-promotora.

55 El genoma de vector vírico del primer aspecto de la divulgación puede proporcionarse como un kit de piezas. Por ejemplo, el kit puede comprender (i) un plásmido o plásmidos que contienen los NOI y una secuencia o secuencias de elementos reguladores internos y (ii) un constructo de genoma retrovírico con sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas para clonación de los NOI y el elemento o elementos reguladores en el genoma vírico.

60 Es conocido que la expresión separada de los componentes necesarios para producir una partícula de vector lentivírico en secuencias de ADN separadas cointroducidas en la misma célula proporcionará partículas lentivíricas portadoras de genomas lentivíricos defectivos que portan genes terapéuticos. Se hace referencia a esta célula como la célula productora (véase a continuación).

65 Hay dos procedimientos comunes para generar células productoras. En uno, se introducen las secuencias que codifican las proteínas Gag, Pol y Env retrovíricas en una célula y se integran establemente en el genoma celular; se

produce una línea celular estable a la que se hace referencia como la línea celular de empaquetamiento. La línea celular de empaquetamiento produce las proteínas necesarias para empaquetar ARN retrovítico, pero no puede causar la encapsidación debido a la falta de una región psi. Sin embargo, cuando se introduce un genoma de vector según el primer aspecto de la invención (que tiene una región psi) en la línea celular de empaquetamiento, las proteínas auxiliares pueden empaquetar el ARN del vector recombinante positivo de psi, produciendo una provisión de virus recombinante. Esta puede usarse para transducir el NOI en células receptoras. El virus recombinante cuyo genoma carece de todos los genes necesarios para preparar proteínas víricas puede infectar solo una vez y no puede propagarse. Por tanto, se introduce el NOI en el genoma de la célula hospedadora sin generación de retrovirus potencialmente dañinos. Se presenta un resumen de las líneas de empaquetamiento disponibles en "Retroviruses" (1997, Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, pág. 449).

La presente invención proporciona también una línea celular de empaquetamiento que comprende un genoma de vector vírico del primer aspecto de la invención. Por ejemplo, la línea celular de empaquetamiento puede transducirse con un sistema de vector vírico que comprende el genoma o transfectarse con un plásmido portador de un constructo de ADN capaz de codificar el genoma de ARN. La presente invención puede proporcionar también una partícula de vector lentivírico producida por dicha célula.

El segundo enfoque es introducir las tres diferentes secuencias de ADN que son necesarias para producir una partícula de vector retrovítico, concretamente la secuencia de codificación de env, la secuencia de codificación de gag-pol y el genoma retrovítico defectivo que contiene uno o más NOI en la célula al mismo tiempo mediante transfección transitoria, y se hace referencia al procedimiento como transfección transitoria triple (Landau y Littman 1992; Pear et al. 1993). El procedimiento de transfección triple se ha optimizado (Soneoka et al. 1995; Finer et al. 1994). El documento WO 94/29438 describe la producción de células productoras in vitro usando este procedimiento de transfección transitoria múltiple de ADN.

Los componentes del sistema vírico que son necesarios para complementar el genoma de vector pueden estar presentes en uno o más "plásmidos productores" para transfectar en células.

La presente invención proporciona también un sistema de vector que comprende:

(i) un genoma vírico según el primer aspecto de la invención;

(ii) una secuencia nucleotídica que codifica las proteínas gag y pol lentivíricas;

(iii) secuencias nucleotídicas que codifican otros componentes de empaquetamiento víricos esenciales no codificados por la secuencia nucleotídica de ii). En una realización preferida, la secuencia nucleotídica de (iii) es capaz de codificar una proteína env. La presente invención proporciona también una célula transfectada con dicho sistema de vector y una partícula de vector lentivírico producida por dicha célula. Preferiblemente, la secuencia de gag-pol tiene optimización de codones para uso en la célula productora particular (véase a continuación).

La proteína env codificada por la secuencia nucleotídica de (iii) puede ser una proteína env retrovítica o lentivítica homóloga. Como alternativa, puede ser una env heteróloga o una env de un no retrovirus ni lentivirus (véase a continuación "seudotipado").

El término "sistema de vector vírico" se usa generalmente para indicar un kit de piezas que puede usarse combinado con otros componentes necesarios para la producción de partículas víricas para producir partículas víricas en células hospedadoras. Por ejemplo, el genoma de vector retrovítico puede carecer de uno o más de los genes necesarios para replicación vírica. Este puede combinarse en un kit con una secuencia o secuencias nucleotídicas complementarias adicionales, por ejemplo en uno o más plásmidos productores. Mediante la cotransfección del genoma junto con el plásmido o plásmidos productores, deberían proporcionarse los componentes necesarios para la producción de partículas víricas infecciosas.

Como alternativa, la secuencia o secuencias nucleotídicas complementarias pueden estar presentes establemente en una línea celular de empaquetamiento que se incluye en el kit.

La presente invención se refiere también un sistema de vector lentivírico que es capaz de suministrar un genoma de ARN a una célula receptora, como se define en las reivindicaciones, en las que el genoma es más largo que el genoma de tipo silvestre del retrovirus. El sistema de vector puede ser, por ejemplo, un sistema de vector de ELAV.

Preferiblemente, el genoma de ARN del sistema de vector tiene hasta un 5%, más preferiblemente hasta un 10% más bases que el genoma de tipo silvestre. Preferiblemente, el genoma de ARN es aproximadamente un 10% más largo que el genoma de tipo silvestre. Por ejemplo, el EIAV de tipo silvestre comprende un genoma de ARN de aproximadamente 8 kb. Un sistema de vector de EIAV de la presente invención puede tener un genoma de ARN de hasta (preferiblemente aproximadamente) 8,8 kb.

El sistema de vector lentivírico de la presente invención es un sistema de vector autoinactivante (SIN).

A modo de ejemplo, se han construido sistemas de vector retrovítico autoinactivante eliminando los potenciadores transcripcionales o los potenciadores y promotores de la región U3 de la 3' LTR. Después de una ronda de transcripción inversa e integración del vector, se copian estos cambios en ambas 5' y 3' LTR, produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, cualquier promotor interno en las LTR en dichos vectores seguirá siendo transcripcionalmente activo. Esta estrategia se ha empleado para eliminar los efectos de potenciadores y promotores en las LTR víricas sobre la transcripción de genes dispuestos internamente. Dichos efectos incluyen una transcripción aumentada o la supresión de la transcripción. Esta estrategia puede usarse también para eliminar la transcripción en 3' de la 3' LTR a ADN genómico. Este es una preocupación particular de la terapia génica humana, donde puede ser importante prevenir la activación accidental de un oncogén endógeno.

Preferiblemente, se usa un mecanismo auxiliado por recombinasa que facilita la producción de vectores lentivíricos regulados de alto título a partir de las células productoras de la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, el término "sistema auxiliado por recombinasa" incluye, pero sin limitación, un sistema que usa los sitios de reconocimiento de recombinasa Cre/loxP del bacteriófago P1 o la recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae*, que cataliza eventos de recombinación entre dianas de reconocimiento de FLP de 34 pb (FRT).

La recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae* que cataliza eventos de recombinación entre dianas de reconocimiento de FLP de 34 pb (FRT) se ha configurado en constructos de ADN para generar líneas celulares productoras de alto nivel usando eventos de recombinación auxiliada por recombinasa (Karreman et al. (1996) NAR 24: 1616-1624). Se ha desarrollado un sistema similar usando los sitios de reconocimiento de recombinasa Cre loxP del bacteriófago P1 (Vanin et al. (1997) J. Virol. 71: 7820-7826). Este se ha configurado en un genoma lentivírico de tal modo que se generaran líneas celulares productoras lentivíricas de alto título.

Al usar líneas celulares productoras/de empaquetamiento, es posible propagar y aislar cantidades de partículas de vector retrovítico (por ejemplo, para preparar títulos adecuados de partículas de vector retrovítico) para la posterior transducción de, por ejemplo, un sitio de interés (tal como tejido de cerebro adulto). Las líneas celulares productoras son habitualmente mejores para la producción a gran escala que las partículas de vector.

La transfección transitoria tiene numerosas ventajas frente al procedimiento celular de empaquetamiento. A este respecto, la transfección transitoria evita el mayor tiempo requerido para generar líneas celulares productoras de vector estables y se usa si el genoma de vector o componentes del empaquetamiento retrovítico son tóxicos para las células. Si el genoma de vector codifica genes tóxicos o genes que interfieren con la replicación de la célula hospedadora, tales como inhibidores del ciclo celular o genes que inducen la apoptosis, puede ser difícil generar líneas celulares productoras de vector estables, pero puede usarse la transfección transitoria para producir el vector antes que las células mueran. También se han desarrollado líneas celulares que usan la infección transitoria que producen niveles de título de vector que son comparables con los niveles obtenidos a partir de líneas celulares productoras de vector estables (Pear et al. 1993, PNAS 90: 8392-8396).

Las células productoras/células de empaquetamiento pueden ser de cualquier tipo celular adecuado. Las células productoras son generalmente células de mamífero pero pueden ser, por ejemplo, células de insecto.

Como se usa en la presente memoria, el término "célula productora" o "célula productora de vector" hace referencia a una célula que contiene todos los elementos necesarios para la producción de partículas de vector lentivírico.

Preferiblemente, la célula productora es obtenible a partir de una línea celular productora estable.

Preferiblemente, la célula productora es obtenible a partir de una línea celular productora estable derivada.

Preferiblemente, la célula productora es obtenible a partir de una línea celular productora derivada.

Como se usa en la presente memoria, el término "línea celular productora derivada" es una línea celular productora transducida que se ha cribado y seleccionado para la alta expresión de un gen marcador. Dichas líneas celulares soportan un alto nivel de expresión del genoma retrovítico. El término "línea celular productora derivada" se usa intercambiabilmente con el término "línea celular productora estable derivada" y el término "línea celular productora estable".

Preferiblemente, la línea celular productora derivada incluye, pero sin limitación, una célula productora retrovítica y/o lentivírica.

Preferiblemente, la línea celular productora derivada es una línea celular productora de VIH o EIAV, más preferiblemente una línea celular productora de EIAV.

Preferiblemente, las secuencias de proteína de cubierta y secuencias de nucleocápsida están todas integradas establemente en la célula productora y/o de empaquetamiento. Sin embargo, una o más de estas secuencias podría existir también en forma episómica y podría ocurrir expresión génica a partir del episoma.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "célula de empaquetamiento" hace referencia a una célula que contiene aquellos elementos necesarios para la producción de un virus recombinante infeccioso de los que carece el genoma de ARN. Típicamente, dichas células de empaquetamiento contienen uno o más plásmidos productores que son capaces de expresar proteínas estructurales víricas (tales como gag-pol y env con optimización de codones) pero no contienen una señal de empaquetamiento.

10 El término "señal de empaquetamiento", al que se hace referencia intercambiamente como "secuencia de empaquetamiento" o "psi", se usa con referencia a la secuencia no codificante de acción en cis requerida para la encapsidación de hebras de ARN retrovírico durante la formación de partículas víricas. En HIV-1, esta secuencia se ha cartografiado en loci que se extienden en 5' del sitio donante de corte y empalme principal (SD) hasta al menos el
15 codón de inicio de gag.

Pueden prepararse fácilmente líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para uso con los constructos de vector descritos anteriormente (véase también el documento WO 92/05266), y utilizarse para crear líneas celulares productoras para la producción de partículas de vector retrovírico. Como ya se ha mencionado, se presenta un
20 resumen de las líneas de empaquetamiento disponibles en "Retrovirus" (como anteriormente).

Como también se discute anteriormente, se ha encontrado que las líneas celulares de empaquetamiento sencillas, que comprenden un provirus en que se ha eliminado la señal de empaquetamiento, conducen a la rápida producción de virus competentes de replicación indeseables mediante recombinación. Para mejorar la seguridad, se han
25 producido líneas celulares de segunda generación en las que se elimina la 3' LTR del provirus. En dichas células, serían necesarias dos recombinaciones para producir un virus de tipo silvestre. Una mejora adicional implica la introducción de los genes gag-pol y el gen env en constructos separados en las llamadas líneas celulares de empaquetamiento de tercera generación. Estos constructos se introducen secuencialmente para evitar la recombinación durante la transfección.

30 Preferiblemente, las líneas celulares de empaquetamiento son líneas celulares de empaquetamiento de segunda generación.

35 Preferiblemente, las líneas celulares de empaquetamiento son líneas celulares de empaquetamiento de tercera generación.

En estas líneas celulares de tercera generación de constructo escindido, puede conseguirse una reducción adicional de la recombinación cambiando los codones. Esta técnica, basada en la redundancia del código genético, se orienta a reducir la homología entre los constructos separados, por ejemplo entre las regiones de superposición en los
40 marcos de lectura abiertos de gag-pol y env.

Las líneas celulares de empaquetamiento son útiles para proporcionar los productos génicos necesarios para encapsidar y proporcionar una proteína de membrana para la producción de partículas de vector de alto título. La célula de empaquetamiento puede ser una célula cultivada in vitro tal como una línea celular de cultivo de tejido. Las
45 líneas celulares adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de mamífero tales como líneas celulares derivadas de fibroblasto de murino o líneas celulares humanas. Preferiblemente, la línea celular de empaquetamiento es una línea celular humana tal como, por ejemplo: HEK293, 293-T, TE671, HT1080.

50 Como alternativa, la célula de empaquetamiento puede ser una célula derivada del individuo para tratar tal como un monocito, macrófago, célula sanguínea o fibroblasto. La célula puede aislarse del individuo y administrarse los componentes de empaquetamiento y de vector ex vivo seguidos de la readministración de las células de empaquetamiento autólogas.

55 Con más detalle, la célula de empaquetamiento puede ser una célula de empaquetamiento in vivo en el cuerpo del individuo para tratar o puede ser una célula cultivada in vitro tal como una línea celular de cultivo de tejido. Las líneas celulares adecuadas incluyen células de mamífero tales como líneas celulares derivadas de fibroblasto de murino o líneas celulares humanas. Preferiblemente, la línea celular de empaquetamiento es una línea celular humana, tal como por ejemplo una línea celular 293, HEK293, 293-T, TE671, HT1080.

60 Como alternativa, la célula de empaquetamiento puede ser una célula derivada del individuo para tratar tal como un monocito, macrófago, citoblasto, célula sanguínea o fibroblasto. La célula puede aislarse del individuo y administrarse los componentes de empaquetamiento y de vector ex vivo seguidos de la readministración de las células de empaquetamiento autólogas. Como alternativa, los componentes de empaquetamiento y de vector pueden administrarse a la célula de empaquetamiento in vivo. Los procedimientos para introducir componentes de
65 empaquetamiento lentivírico y de vector en células de un individuo son conocidos en la materia. Por ejemplo, es un enfoque introducir las diferentes secuencias de ADN que se requieren para producir una partícula de vector

lentivírico, por ejemplo, la secuencia de codificación de env, la secuencia de codificación de gag-pol y el genoma lentivírico defectivo, en la célula simultáneamente mediante transfección transitoria triple (Landau y Littman 1992, J. Virol. 66, 5110; Soneoka et al. 1995 Nucleic Acids Res. 23: 628-633).

5 En una realización, las configuraciones de vector de la presente invención usan como sistema de producción tres unidades de transcripción que expresan un genoma, los componentes gag-pol y una cubierta. El módulo de expresión de cubierta puede incluir una de una serie de cubiertas tales como VSV-G o diversas cubiertas de retrovirus de murino tales como 4070A.

10 Convencionalmente, estos tres módulos se expresarían a partir de tres plásmidos transfectados transitoriamente en una línea celular apropiada tal como 293T o a partir de copias integradas en una línea celular productora estable. Es un enfoque alternativo usar otro virus como sistema de expresión para los tres módulos, por ejemplo baculovirus o adenovirus. Estos son ambos sistemas de expresión nuclear. Hasta la fecha, no se ha descrito el uso de poxvirus para expresar todos los componentes de un sistema de vector lentivírico. En particular, dado el uso de codón
15 inhabitual de los lentivirus y su requisito de sistemas de manejo de ARN como el sistema rev/RRE, no ha estado claro si es factible la incorporación de los tres módulos y su posterior expresión en un vector que se exprese en citoplasma en lugar de en núcleo. Hasta ahora, existía la posibilidad de que se requirieran factores nucleares clave y rutas de manejo de ARN nuclear para la expresión de los componentes del vector y su función en el vehículo de suministro génico. Aquí, los inventores describen dicho sistema y muestran que los componentes lentivíricos pueden
20 prepararse en citoplasma y que se ensamblan en sistemas de suministro génico funcionales. La ventaja de este sistema es la facilidad con la que pueden manejarse los poxvirus, los altos niveles de expresión y la capacidad de retener intrones en los genomas de vector.

25 La partícula de vector lentivírico según la invención será también capaz de transducir células que son de división lenta, y que no lentivirus tales como MLV no serían capaces de transducir eficazmente. Las células de división lenta se dividen una vez cada tres a cuatro días, incluyendo ciertas células tumorales. Aunque los tumores contienen células de división rápida, algunas células tumorales, especialmente aquellas en el centro del tumor, se dividen infrecuentemente. Como alternativa, la célula diana puede ser una célula de crecimiento detenido capaz de experimentar división celular tal como una célula en la parte central de una masa tumoral o un citoblasto tal como un
30 citoblasto hematopoyético o una célula positiva de CD34. Como alternativa adicional, la célula diana puede ser la precursora de una célula diferenciada tal como un precursor de monocito, una célula positiva de CD33 o un precursor mielóide. Como alternativa adicional, la célula diana puede ser una célula diferenciada tal como una neurona, astrocito, gliocito, microglíocito, macrófago, monocito, célula epitelial, célula endotelial o hepatocito. Las células diana pueden transducirse in vitro tras el aislamiento a partir de un individuo humano o pueden transducirse
35 directamente in vivo.

Es altamente deseable usar preparaciones de virus de alto título en aplicaciones tanto experimentales como prácticas. Las técnicas para aumentar el título vírico incluyen usar un psi más señal de empaquetamiento como se discute anteriormente y la concentración de las provisiones de virus.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "alto título" significa una cantidad eficaz de un vector o partícula lentivírico que es capaz de transducir un sitio diana tal como una célula.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" significa una cantidad de un vector o partícula de vector lentivírico regulado que es suficiente para inducir la expresión de los NOI en un sitio diana.

Una preparación vírica de alto título para una célula productora/de empaquetamiento es habitualmente del orden de 10^5 a 10^7 partículas retrovíricas por ml. Para transducción en tejidos tales como el cerebro, es necesario usar volúmenes muy pequeños, de modo que la preparación vírica se concentra mediante ultracentrifugación. La
50 preparación resultante debería tener al menos 10^8 u.t./ml, preferiblemente de 10^8 a 10^9 u.t./ml, más preferiblemente al menos 10^9 u.t./ml. (El título se expresa en unidades de transducción por mol (u.t./ml) titulado en una línea celular D17 estándar).

55 Los NOI están ligados operativamente con uno o más elementos promotores/potenciadores. Preferiblemente, el promotor es un promotor fuerte tal como el de CMV. El promotor puede ser un promotor regulado. El promotor puede ser específico de tejido.

60 La presencia de una secuencia llamada tramo central de polipurina (cPPT) puede mejorar la eficacia del suministro génico a células no en división. Este elemento de acción en cis está localizado, por ejemplo, en el elemento de la región de codificación de polimerasa de EIAV. Preferiblemente, el genoma de la presente invención comprende una secuencia de cPPT.

65 Preferiblemente, el genoma vírico comprende un elemento regulador postranscripcional. Por ejemplo, el genoma puede comprender un elemento tal como el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPPE).

Además, o como alternativa, el genoma vírico puede comprender un potenciador traduccional.

Seudotipado

5 En el diseño de sistemas de vector retrovítico, es deseable genomanipular partículas con diferentes especificidades por célula diana que el virus nativo, para posibilitar el suministro de material genético a un intervalo aumentado o alterado de tipos celulares. Una manera en que se consigue esto es genomanipulando la proteína de cubierta vírica para alterar su especificidad. Otro enfoque es introducir una proteína de cubierta heteróloga en la partícula de vector para reemplazar o añadir a la proteína de cubierta nativa del virus.

10 El términoseudotipado significa incorporar en al menos una parte de, o sustituir una parte de, o reemplazar todo, un gen env de un genoma vírico (por) un gen env heterólogo, por ejemplo, un gen env de otro virus. Elseudotipado no es un fenómeno nuevo y pueden encontrarse ejemplos en los documentos WO 99/61639, WO-A-98/05759, WO-A-98/05754, WO-A-97/17457, WO-A-96/09400, WO-A-91/00047 y Mebatsion et al. 1997 Cell 90, 841-847.

15 En una realización preferida de la presente invención, el sistema de vector seseudotipa con un gen que codifica al menos parte de la proteína G de la rabia. En una realización preferida adicional de la presente invención, el sistema de vector seseudotipa con un gen que codifica al menos parte de la proteína G de VSV.

20 Con más detalle, el término “partícula lentivítica” hace referencia al vector lentivítico empaquetado, que es preferiblemente capaz de unirse a y entrar en células diana. Los componentes de la partícula, como ya se discutió para el vector, pueden modificarse con respecto al lentivirus de tipo silvestre. Por ejemplo, las proteínas Env en la cubierta proteica de la partícula pueden modificarse genéticamente para alterar su especificidad de diana o conseguir alguna otra función deseada.

25 Preferiblemente, el vector vírico transduce preferiblemente un cierto tipo de célula o tipos de célula.

Más preferiblemente, el vector vírico es un vector orientado, es decir, tiene un tropismo de tejido que está alterado en comparación con el virus nativo, de modo que el vector se orienta a células particulares.

30 Para vectores lentivíticos, esto puede conseguirse modificando la proteína Env. La proteína Env del vector retrovítico secundario tiene que ser una cubierta no tóxica o una cubierta que pueda producirse en cantidades no tóxicas en la célula diana primaria, tal como por ejemplo una cubierta anfotrópica de MMLV o una cubierta anfotrópica modificada. El rasgo de seguridad en dicho caso es preferiblemente la delección de regiones de homología de secuencia entre los componentes lentivíticos.

35 Preferiblemente, la cubierta es una que permita la transducción de células humanas. Los ejemplos de genes env adecuados incluyen, pero sin limitación, VSV-G, un env anfotrópico de MLV tal como el env 4070A, el env del virus de la leucemia felina RD114 o hemaglutinina (HA) de virus de la gripe. La proteína Env puede ser una que sea capaz de unirse a un receptor en un número limitado de tipos de célula humana y puede ser una cubierta genomanipulada que contiene restos orientadores. Las secuencias de codificación de env y gag-pol se transcriben a partir de un promotor y opcionalmente un potenciador activos en la línea celular de empaquetamiento elegida y la unidad transcripcional se termina mediante una señal de poliadenilación. Por ejemplo, si la célula de empaquetamiento es una célula humana, es una combinación de promotor-potenciador adecuada aquella del gen inmediato temprano principal de citomegalovirus humano (hCMV-MIE) y puede usarse una señal de poliadenilación del virus SV40. Son conocidos en la materia otros promotores y señales de poliadenilación adecuados.

Marco de lectura abierto (ORF)

50 La primera secuencia de ácido nucleico es una secuencia que es capaz de aumentar los niveles de ARN genómico que están disponibles para empaquetamiento en ausencia de Rev, por ejemplo, en comparación con la situación en que no está presente la primera secuencia de ácido nucleico. La primera secuencia de ácido nucleico es un marco de lectura abierto (ORF) que aumenta el nivel de ARN genómico disponible para empaquetamiento en ausencia de Rev. Se incluye en ORF una serie de tripletes de codones que incluyen un codón de iniciación 5' (que puede ser una secuencia de Kozak) que abarca hasta un codón de terminación y que representa un gen presunto o conocido. Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia de ácido nucleico que aumente el nivel de ARN genómico para empaquetamiento.

60 Por tanto, la presente invención se refiere a un genoma de vector multicistrónico que tiene un ORF ligado operativamente con la LTR vírica y en 5' de un promotor interno.

65 Cuando el genoma de vector se usa con componentes de empaquetamiento en que está ausente Rev, tales como mediante el uso de un gen gag-pol con optimización de codones, es posible producir un vector totalmente mínimo sin ningún gen vírico accesorio en la célula productora o diana.

Aún sin desear ligarse a teoría alguna, los inventores creen que, en el sistema de la invención, el transcrito de la primera secuencia de ácido nucleico se reconoce por la célula por ser un ARNm "verdadero" y por lo tanto valioso para exportar del núcleo. En ausencia de dicha secuencia, el ARNm parece degradarse en el núcleo, por ejemplo mediante "degradación mediada por mutación terminadora", antes de transportarse al citoplasma y empaquetarse posteriormente. La proteína accesoria Rev parece permitir eludir este sistema de vigilancia y por tanto mantiene los títulos víricos cuando el genoma de vector se degradaría de otro modo. La presente invención proporciona un modo alternativo y más seguro de mantener los títulos víricos.

Debería observarse que un genoma en el que una parte del ORF se invertía daba como resultado dependencias de Rev diferentes de los genomas original y derivado. Aún sin desear ligarse a teoría alguna, los inventores creen que esto es debido a la presencia de un ORF en el genoma original (independiente de Rev) que se destruía en el genoma derivado (dependiente de Rev). Por tanto, el ORF debería estar en la orientación correcta, y no inversa.

El ORF puede ser útilmente de aproximadamente 0,6 a 4 kb, por ejemplo de aproximadamente 0,65 o 0,7 a 3,1 o 3,0 kb.

Preferiblemente, la primera secuencia de ácido nucleico puede ser un gen de selección al que también se hace referencia como marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos. Se dan a continuación detalles adicionales sobre las primeras secuencias de ácido nucleico adecuadas en las secciones sobre genes informadores.

También es posible que la primera secuencia de ácido nucleico sea el nucleótido de interés (NOI) y se dan a continuación detalles adicionales sobre los NOI.

Sistemas de expresión regulados por tetraciclina

En otra realización preferida, la primera secuencia de ácido nucleico es un gen represor Tet, opcionalmente ligado con una señal de localización nuclear (NLS). Aún sin desear ligarse a teoría alguna, los inventores creen que la adición de una NLS al extremo carboxilo aumenta la concentración de TetR en el núcleo, puesto que el extremo amino de TetR es importante para la unión del operador de tetraciclina (tetO). Por tanto, en esta realización, al menos uno de los NOI en 3' será tetO. En una realización preferida, al menos una segunda copia del gen represor Tet está presente en 3' de un IRES o promotor interno.

En una realización preferida adicional, el gen represor Tet tiene optimización de codones para expresar en un sistema de mamífero. Se dan a continuación detalles adicionales sobre la optimización de codones.

Por tanto, los inventores describen una secuencia génica de TetR mejorada para expresión regulada por tetraciclina en células de mamífero obtenida mediante optimización de codones. Los sistemas de expresión regulados por tetraciclina tienen una utilidad de amplio intervalo en muchas aplicaciones en que la expresión génica inducible es ventajosa o esencial. La mejora de la expresión génica que puede surgir de optimizar los codones de la proteína efectora puede potenciar significativamente la eficacia del sistema al facilitar una expresión mediada por TetR más rápida.

Los inventores describen también la alteración de la secuencia 5' del gen TetR de tal modo que el primer AUG esté en un contexto más favorable para expresión, mejorando así la fidelidad de iniciación por ribosomas eucarióticos. En una realización, la secuencia 5' es 5' gccGCCACCAUGG 3'. (La G en posición +4 cambiaría el codón de serina o requeriría la inserción de un residuo aminoácido adicional).

Los inventores describen adicionalmente la incorporación de una NLS que aumenta la concentración local de TetR en el núcleo.

Optimización de codones

La optimización de codones se ha descrito anteriormente en el documento WO 99/41397. Diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Este sesgo de codón corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo celular. Al alterar los codones en la secuencia de modo que se adapten para coincidir con la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión. Por la misma razón, es posible reducir la expresión eligiendo deliberadamente codones que sean conocidos por ser raros para los ARNt correspondientes en el tipo celular particular. Por tanto, está disponible un grado adicional de control traduccional.

Muchos virus, incluyendo VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones raros y, al cambiar estos para que se correspondan con los codones usados habitualmente en mamíferos, puede conseguirse una expresión aumentada de los componentes de empaquetamiento en células productoras de mamífero. Las tablas de uso de codón son conocidas en la materia para células de mamífero, así como para una variedad de otros organismos.

- La optimización de codones tiene otra serie de ventajas. En virtud de las alteraciones de sus secuencias, las secuencias nucleotídicas que codifican los componentes de empaquetamiento de las partículas víricas necesarios para el ensamblaje de partículas víricas en las células productoras/células de empaquetamiento, tienen eliminadas las secuencias de inestabilidad de ARN (INS) de las mismas. Al mismo tiempo, la secuencia que codifica la secuencia aminoacídica para los componentes de empaquetamiento se retiene de modo que los componentes víricos codificados por las secuencias permanecen iguales, o al menos suficientemente similares, de modo que la función de los componentes de empaquetamiento no se comprometa. La optimización de codones supera también el requisito de Rev/RRE para exportación, volviendo las secuencias optimizadas independientes de Rev. La optimización de codones reduce también la recombinación homóloga entre diferentes constructos en el sistema de vector (por ejemplo, entre las regiones de superposición en los marcos de lectura abiertos de gag-pol y env). El efecto global de la optimización de codones es por lo tanto un notable aumento del título vírico y una seguridad mejorada.
- En una realización, solo los codones relativos a INS tienen optimización de codones. Sin embargo, en una realización mucho más preferida y práctica, las secuencias tienen optimización de codones en su totalidad, con la excepción de la secuencia que abarca el sitio de desplazamiento de marco.
- El gen gag-pol comprende dos marcos de lectura superpuestos que codifican las proteínas gag y pol respectivamente. La expresión de ambas proteínas depende de un desplazamiento de marco durante la traducción. Este desplazamiento de marco ocurre como resultado de un “deslizamiento” ribosómico durante la traducción. Este deslizamiento se cree que está causado al menos en parte por estructuras secundarias de ARN que detienen el ribosoma. Dichas estructuras secundarias existen en 3' del sitio de desplazamiento de marco en el gen gag-pol.
- Para VIH, la región de superposición se extiende desde el nucleótido 1222 en 3' del inicio de gag (en el que el nucleótido 1 es la A del ATG de gag) hasta el final de gag (nt 1503). En consecuencia, un fragmento de 281 pb que abarca el sitio de desplazamiento de marco y la región de superposición de los dos marcos de lectura preferiblemente no tiene optimización de codones. Retener este fragmento posibilitará una expresión más eficaz de las proteínas gag-pol.
- Para EIAV, se ha tomado como comienzo de la superposición el nt 1262 (en que el nucleótido 1 es la A de ATG de gag). El final de la superposición está a 1461 pb. Para asegurar que se conservan el sitio de desplazamiento de marco y la superposición de gag-pol, se ha retenido la secuencia de tipo silvestre de nt 1156 a 1465.
- Pueden hacerse derivaciones del uso óptimo de codones, por ejemplo, para acomodar sitios de restricción convenientes, y pueden introducirse cambios aminoacídicos conservativos en las proteínas gag-pol.
- En una realización altamente preferida, la optimización de codones se basaba en genes de mamífero expresados débilmente. Pueden cambiarse la tercera y a veces la segunda y tercera bases.
- Debido a la naturaleza degenerada del código genético, se apreciará que pueden conseguirse numerosas secuencias gag-pol por un trabajador experto. También hay muchas variante retrovíricas descritas que pueden usarse como punto de partida para la generación de una secuencia gag-pol con optimización de codones. Los genomas lentivíricos pueden ser bastante variables. Por ejemplo, hay muchas cuasiespecies de HIV-1 que siguen siendo funcionales. Este es también el caso de EIAV. Estas variantes pueden usarse para potenciar partes particulares del proceso de transducción. Pueden encontrarse ejemplos de variantes de HIV-1 en <http://hiv-web.lanl.gov>. Pueden encontrarse detalles de clones de EIAV en la base de datos NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- La estrategia de secuencias gag-pol y TetR con optimización de codones puede usarse con relación a cualquier retrovirus. Esto se aplicaría a todos los lentivirus, incluyendo EIAV, FIV, BIV, CAEV, VMR, SIV, HIV-1 y HIV-2. Además, este procedimiento podría usarse para aumentar la expresión de genes de HTLV-1, HTLV-2, HFV, HSRV y retrovirus endógenos humanos (HERV), MLV y otros retrovirus.
- La optimización de codones puede volver la expresión de gag-pol independiente de Rev. Para posibilitar el uso de factores anti-rev o RRE en el vector retrovírico, sin embargo, sería necesario volver el sistema de generación vírica totalmente independiente de Rev/RRE. Por tanto, el genoma tiene que modificarse también. Esto se consigue optimizando los componentes del genoma de vector de acuerdo con la presente invención. Ventajosamente, estas modificaciones conducen también a la producción de un sistema más seguro ausente de todas las proteínas adicionales tanto en la célula productora como en la transducida.
- Como se describe anteriormente, los componentes de empaquetamiento para un vector retrovírico incluyen los productos de expresión de los genes gag, pol y env. Además, un empaquetamiento eficaz depende de una corta secuencia de 4 horquillas seguidas de una secuencia parcial de gag y env (la “señal de empaquetamiento”). Por tanto, la inclusión de una secuencia gag eliminada en el genoma de vector retrovírico (además de la secuencia gag completa en el constructo de empaquetamiento) optimizará el título de vector. Hasta la fecha, se ha reseñado que un empaquetamiento eficaz requiere de 255 a 360 nucleótidos de gag en vectores que siguen reteniendo secuencias de env, o aproximadamente 40 nucleótidos de gag en una combinación particular de mutación de donante de corte y

empalme, deleciones de gag y env. Se ha encontrado sorprendentemente que una deleción de todo menos los 360 o así nucleótidos N-terminales de gag conduce a un aumento del título de vector. Por tanto, preferiblemente, el genoma de vector retrovívico incluye una secuencia de gag que comprende una o más deleciones, más preferiblemente la secuencia de gag comprende aproximadamente 360 nucleótidos derivables del extremo N.

La secuencia de TetR puede someterse útilmente a optimización de codones usando los codones mostrados en la figura 21.

NOI

En la presente invención, el término NOI (secuencia nucleotídica de interés) se refiere a secuencias nucleotídicas útiles en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo. También se divulga cualquier secuencia nucleotídica adecuada que no tiene que ser necesariamente una secuencia de ADN o ARN de origen natural completa. Por tanto, el NOI puede ser, por ejemplo, una secuencia de ARN/ADN sintética, una secuencia de ARN/ADN recombinante (concretamente, preparada mediante el uso de técnicas de ADN recombinante), una secuencia de ADNc o una secuencia de ADN genómico parcial, incluyendo combinaciones de las mismas. La secuencia no tiene que ser una región de codificación. Si es una región de codificación, no tiene que ser una región de codificación entera. Además, la secuencia de ARN/ADN puede estar en orientación codificante o en orientación anticodificante. Preferiblemente, está en orientación codificante. Preferiblemente, la secuencia es de, o se transcribe a partir de, ADNc.

Los NOI, a los que también se hace referencia como "secuencias heterólogas", "genes heterólogos" o "transgenes" pueden ser uno cualquiera o más de, por ejemplo, uno o varios genes de selección, genes marcadores o genes terapéuticos.

El NOI puede ser un gen candidato que es de significación potencial en un proceso patológico. Por tanto, el sistema de vector de la presente invención puede usarse, por ejemplo, con fines de validación de diana.

El NOI tiene una aplicación terapéutica. Los NOI adecuados incluyen, pero sin limitación: secuencias que codifican enzimas, citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas antioxidantes, moléculas de tipo inmunoglobulina genomanipuladas, un anticuerpo monocatenario, proteínas de fusión, moléculas coestimuladoras inmunitarias, moléculas inmunomoduladoras, un ARN anticodificante, un mutante negativo transdominante de una proteína diana, una toxina, una toxina condicional, un antígeno, una proteína y factores de crecimiento supresores tumorales, proteínas de membrana, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas y ribozimas antivíricas y derivados de los mismos (tales como con un grupo informador asociado). Los NOI pueden codificar también enzimas activadoras de profármacos.

La secuencia de codificación de NOI puede codificar un segmento de una secuencia de codificación.

El NOI es útil en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

Preferiblemente, el NOI es útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El NOI puede codificar una enzima involucrada en la síntesis de la dopamina. Por ejemplo, la enzima puede ser una de las siguientes: tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidrolasa 1 y/o aminoácido aromático DOPA-descarboxilasa. Las secuencias de los tres genes están disponibles en los números de orden: X05290, U19523 y M76180, respectivamente.

Alternativamente, el NOI puede codificar el transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (VMAT2). En una realización preferente, el genoma vírico comprende un NOI que codifica el aminoácido aromático DOPA-descarboxilasa y un NOI que codifica el VMAT2. Tal genoma puede utilizarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en particular, junto con la administración periférica de la L-DOPA.

Alternativamente, el NOI puede codificar un factor capaz de bloquear o inhibir la degeneración del sistema nigroestriatal. Un ejemplo de tal factor es un factor neurotrófico. Por ejemplo, el NOI puede codificar el factor neurotrófico obtenido de la línea celular glial (GDNF) o el factor neurotrófico obtenido del cerebro (BDNF).

Como alternativa, el NOI puede codificar un factor neuroprotector. En particular, los NOI pueden codificar moléculas que evitan que las neuronas positivas de TH mueran o que estimulan la regeneración y recuperación funcional en el sistema nigroestriado dañado.

El NOI puede codificar toda o parte de la proteína de interés ("POI") o un mutante, homólogo o variante de la misma. Por ejemplo, el NOI puede codificar un fragmento de la POI que es capaz de funcionar in vivo de manera análoga a la proteína de tipo silvestre.

En una realización altamente preferida, uno de los NOI comprende una forma truncada del gen TH, que carece del dominio regulador. Dicho NOI evita la inhibición por retroalimentación por dopamina que puede limitar la expresión de la enzima completa.

- 5 El término "mutante" incluye POI que incluyen una o más variaciones aminoacídicas de la secuencia de tipo silvestre. Por ejemplo, un mutante puede comprender una o más adiciones, deleciones o sustituciones aminoacídicas. Un mutante puede surgir naturalmente o puede crearse artificialmente (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a sitio).

10 Sitio interno de entrada de ribosoma (IRES)

El genoma vírico del primer aspecto de la invención comprende uno o más NOI. Para expresar más de un NOI, puede haber dos o más unidades de transcripción en el genoma de vector, una por cada NOI. Sin embargo, resulta evidente por la bibliografía que los vectores retrovíricos alcanzan los títulos más altos y las propiedades de expresión génica más potentes si se mantienen genéticamente simples (documento PCT/GB96/01230; Bowtell et al., 1988 J. Virol. 62, 2464; Correll et al., 1994 Blood 84, 1812; Emerman y Temin 1984 Cell 39, 459; Ghattas et al.,; Hantzopoulos et al., 1989 PNAS 86, 3519; Hatzoglou et al., 1991 J. Biol. Chem. 266, 8416; Hatzoglou et al., 1988 J. Biol. Chem. 263, 17798; Li et al., 1992 Hum. Gen. Ther. 3, 381; McLachlin et al., 1993 Virol. 195, 1; Overell et al., 1988 Mol. Cell Biol. 8, 1803; Scharfman et al., 1991 PNAS 88, 4626; Vile et al., 1994 Gene Ther. 1, 307; Xu et al., 1989 Virol. 171, 331; Yee et al., 1987 PNAS 84, 5197) y así es preferible usar un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) para iniciar la traducción de la segunda (y posteriores) secuencias de codificación en un mensaje policistrónico (Adam et al. 1991 J. Virol. 65, 4985).

La inserción de elementos de IRES en vectores retrovíricos es compatible con el ciclo de replicación retroviral y permite la expresión de múltiples regiones de codificación a partir de un solo promotor (Adam et al. (como anteriormente); Koo et al. (1992) Virology 186: 669-675; Chen et al. 1993 J. Virol. 67: 2142-2148). Los elementos de IRES se encontraron por primera vez en los extremos 5' no traducidos de picornavirus, donde promueven la traducción independiente de cap de proteínas víricas (Jang et al. (1990) Enzyme 44: 292-309). Cuando se localizan entre marcos de lectura abiertos en un ARN, los elementos de IRES permiten una traducción eficaz del marco de lectura abierto en 3' al promover la entrada del ribosoma en el elemento de IRES seguido de la iniciación de la traducción en 3'.

Se presenta una revisión de IRES por Mountford y Smith (TIG mayo de 1995, vol 11, n° 5: 179-184). Son conocidas una serie de diferentes secuencias de IRES incluyendo aquellas del virus de encefalomiocarditis (EMCV) (Ghattas, I.R., et al., Mol. Cell. Biol., 11: 5848-5859 (1991); proteína BiP [Macejak y Sarnow, Nature 353: 91 (1991)]; el gen Antennapedia de Drosophila (exones d y e) [Oh, et al., Genes & Development, 6: 1643-1653 (1992)], así como las del virus de la polio (PV) [Pelletier y Sonenberg, Nature 334: 320-325 (1988)]; véase también Mountford y Smith, TIG 11, 179-184 (1985)].

40 Según el documento WO-A-97/14809, las secuencias de IRES se encuentran típicamente en la región 5' no codificante de los genes. Además de aquellas de la bibliografía, pueden encontrarse empíricamente buscando secuencias genéticas que afecten a la expresión y determinando entonces si esa secuencia afecta al ADN (concretamente, actúa como promotor o potenciador) o solo al ARN (actúa como secuencia de IRES).

45 Los elementos de IRES de PV, EMCV y virus de la enfermedad vesicular porcina se han usado anteriormente en vectores retrovíricos (Coffin et al., como anteriormente).

El término "IRES" incluye cualquier secuencia o combinación de secuencias que funcione como, o mejore la función de, un IRES.

50 El o los IRES pueden ser de origen vírico (tales como IRES de EMCV o IRES de PV) o de origen celular.

Para que el IRES sea capaz de iniciar la traducción de cada NOI, debería estar localizado entre NOI en el genoma de vector. En otras palabras, siempre habrá algunas secuencias de IRES menos que NOI. Por ejemplo, para una secuencia multicistrónica que contiene n NOI, el genoma puede ser como sigue:

$[(NOI_{1-n-1})-(IRES_{1-n-1})]-NOI_n$

Para secuencias bicistrónicas y tricistrónicas, el orden puede ser como sigue:

60 $NOI_1-IRES_1-NOI_2$

$NOI_1-IRES_1-NOI_2-IRES_2-NOI_3$

65 El uno o más NOI están ligados operativamente con un promotor interno. Se da a continuación una discusión sobre promotores. Es posible usar una combinación de promotores e IRES.

Células transducidas

La presente invención se refiere también a una célula que se ha transducido con un sistema de vector que comprende un genoma vírico según el primer aspecto de la invención.

5 La transducción con el sistema de vector de la presente invención puede conferir o aumentar la capacidad de la célula de producir catecolaminas. Por ejemplo, puede conferir o aumentar la capacidad de la célula de convertir tirosina en L-dopa y/o L-dopa en dopamina. La liberación de catecolaminas puede medirse mediante técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, usando un detector electroquímico conectado con una celda analítica. Además de las catecolaminas mismas, pueden detectarse también subproductos asociados a la liberación de catecolamina (tales como DOPAC, un producto de degradación específico de dopamina).

15 La célula puede transducirse in vivo, in vitro o ex vivo. Por ejemplo, si la célula es una célula de un sujeto mamífero, la célula puede retirarse del sujeto y transducirse fácilmente para reimplantación en el sujeto (transducción ex vivo). Como alternativa, la célula puede transducirse mediante transferencia génica in vivo, usando el sistema de vector de la presente invención de acuerdo con técnicas estándares (tales como mediante inyección de provisiones de vector que expresa los NOI). Si la célula es parte de una línea celular que es estable en cultivo (concretamente, que puede sobrevivir a numerosos pasos y puede multiplicarse in vitro), puede transducirse entonces in vitro mediante técnicas estándares, por ejemplo, mediante la exposición de la célula a sobrenadantes víricos que comprenden vectores que expresan los NOI.

25 La célula puede ser cualquier célula que sea susceptible de transducción. Si el sistema vector es capaz de transducir células no en división (por ejemplo, si es un sistema lentivírico), entonces la célula puede ser una célula no en división tal como una neurona.

En una realización preferida, la célula transducida forma parte de una línea celular neuronal modificada genéticamente. Dicha línea celular puede transplantarse, por ejemplo, al cerebro para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

30 En una realización adicional, la célula es un citoblasto neuronal. Dicha línea celular puede transplantarse, por ejemplo, al cerebro para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

35 En una realización adicional, la célula es una célula en el cuerpo estriado de un sujeto, tal como una neurona o gliocito. La transferencia génica directa in vivo a dicha célula puede convertirla, por ejemplo, en una célula productora de dopamina.

Módulos

40 Los inventores describen también módulos multicistronicos que comprenden un ORF y dos o más NOI ligados operativamente por un elemento regulador tal como un IRES o promotor interno. Estos módulos pueden usarse en un procedimiento para la producción de genoma de vector en una célula productora.

45 Los inventores describen también un vector de expresión que comprende dicho módulo. La transfección de una célula adecuada con dicho vector de expresión debería dar como resultado una célula que expresa cada POI codificada por el NOI en el módulo.

50 La clonación del módulo en un vector de expresión y la transfección de células con el vector (para dar la expresión del módulo) pueden llevarse a cabo mediante técnicas bien conocidas en la materia (tales como las descritas en Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), y otros libros de texto de laboratorio).

El módulo puede comprender un promotor. El módulo puede ser bicistronico o tricistronico y comprender los siguientes elementos:

55 LTR-ORF-promotor-(NOI₁)-(IRES₁)-(NOI₂)

LTR-ORF-promotor-(NOI₁)-(IRES₁)-(NOI₂)-(IRES₂)-(NOI₃)

60 El módulo puede ser bicistronico y comprender un NOI que codifica tirosina hidroxilasa (o un mutante, variante u homólogo del mismo) y un NOI que codifica GTP-ciclohidrolasa I (o un mutante, variante u homólogo del mismo).

El módulo puede ser tricistronico y comprender un NOI que codifica tirosina hidroxilasa (o un mutante, variante u homólogo del mismo), un NOI que codifica GTP-ciclohidrolasa I (o un mutante, variante u homólogo del mismo) y un NOI que codifica aminoácido aromático DOPA descarboxilasa (o un mutante, variante u homólogo del mismo).

65

Vector

5 Como es bien conocido en la materia, un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. De acuerdo con la presente invención, y a modo de ejemplo, algunos vectores usados en técnicas de ADN recombinante permiten transferir entidades, tales como un segmento de ADN (tal como un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo) a una célula hospedadora con fines de replicación de los vectores que comprenden un segmento de ADN. Los ejemplos de vectores usados en técnicas de ADN recombinante incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus.

10 El término "vector" incluye vectores de expresión y/o vectores de transformación.

El término "vector de expresión" significa un constructo capaz de expresión in vivo o in vitro/ex vivo.

15 El término "vector de transformación" significa un constructo capaz de transferencia de una especie a otra.

Vector lentivírico

El vector vírico capaz de transducir una célula diana no en división o en división lenta es un vector lentivírico.

20 Los vectores lentivíricos son parte de un grupo mayor de vectores retrovíricos.

El vector de la presente invención puede suministrarse a un sitio diana mediante un vector vírico o no vírico.

25 Los sistemas de suministro no víricos incluyen, pero sin limitación, procedimientos de transfección de ADN. Aquí, la transfección incluye un proceso que usa un vector no vírico para suministrar un gen a una célula de mamífero diana.

30 Los procedimientos de transfección típicos incluyen electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípido, transfección mediada por ADN compactado, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, mediada por agente catiónico, anfífilos faciales catiónicos (CFA) (Nature Biotechnology 199614; 556), y combinaciones de los mismos.

35 Los sistemas de suministro vírico incluyen, pero sin limitación, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado (AAV), vector herpesvírico, vector retrovírico, vector lentivírico y vector baculovírico. Otros ejemplos de vectores incluyen sistemas de suministro ex vivo que incluyen, pero sin limitación, procedimientos de transfección de ADN tales como electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípido y transfección mediada por ADN compactado.

El suministro de uno o más genes terapéuticos por un sistema de vector según la presente invención puede usarse solo o en combinación con otros tratamientos o componentes del tratamiento.

40 Ligado operativamente

El término "ligado operativamente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida.

45 Promotores

50 El término promotor es bien conocido en la materia y se usa en el sentido normal de la materia, por ejemplo, como sitio de unión de ARN polimerasa. El término engloba regiones de ácido nucleico en el intervalo de tamaño y complejidad desde promotores mínimos hasta promotores que incluyen elementos en 5' y potenciadores.

55 El promotor se selecciona típicamente de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque pueden usarse promotores funcionales en otras células eucarióticas. El promotor deriva típicamente de secuencias promotoras de genes víricos o eucarióticos. Por ejemplo, puede ser un promotor derivado del genoma de una célula en que va a ocurrir la expresión. Con respecto a los promotores eucarióticos, pueden ser promotores que funcionen de manera ubicua (tales como los promotores de α -actina, β -actina o tubulina) o, como alternativa, de manera específica de tejido (tal como los promotores de los genes de piruvato cinasa).

60 Preferiblemente, el promotor es un promotor H5 o sE/L modificado (véase Carroll, MW, GW Wilkinson y K Lunstrom 2001 "Mammalian expression systems and vaccination", "Genetically Engineered Viruses" Ed CJ Ring & ED Blair pág.107-157 BIOS Scientific Oxford RU).

Preferiblemente, el promotor es un promotor temprano-tardío usado para la producción máxima de proteína y que permite una sensibilidad óptima durante el proceso de identificación de anticuerpo.

65 Es una combinación de promotor-potenciador preferida la combinación de promotor/potenciador inmediato temprano principal (MIE) de citomegalovirus humano (hCMV).

Preferiblemente, el promotor se diseña usando los datos de Davison y Moss (J. Mol. Biol. 1989 210: 749-769).

El nivel de expresión de una o varias secuencias nucleotídicas bajo el control de un promotor particular puede modularse manipulando la región promotora. Por ejemplo, diferentes dominios en una región promotora pueden poseer diferentes actividades reguladoras génicas. Los papeles de estas diferentes regiones se evalúan típicamente usando constructos de vector que tienen diferentes variantes del promotor con regiones específicas eliminadas (es decir, análisis de delección).

Preferiblemente, el promotor es un promotor regulado por la hipoxia.

Preferiblemente, el promotor regulado por la hipoxia es un promotor regulado por la hipoxia específico de célula.

Preferiblemente, el promotor regulado por la hipoxia deriva de una combinación de restos de unión a ADN conocidos óptima para un tipo celular particular.

El potenciador y/o promotor puede ser preferiblemente activo en entorno hipóxico o isquémico o bajo en glucosa, cuando la célula hospedadora se cultiva en ciertas condiciones tales como condiciones isquémicas. El elemento potenciador, u otros elementos que confieren expresión regulada, pueden estar presentes en múltiples copias. El potenciador y/o promotor pueden ser preferiblemente activos en un entorno hipóxico o isquémico o bajo en glucosa, cuando la célula hospedadora se cultiva en ciertas condiciones tales como condiciones isquémicas. El elemento potenciador u otros elementos que confieren expresión regulada pueden estar presentes en múltiples copias.

Igualmente, o además, el potenciador y/o promotor pueden ser preferentemente activos en uno o más tipos de células hospedadoras específicas, tales como una cualquiera o más de macrófagos, células endoteliales o combinaciones de las mismas.

Preferiblemente, los promotores específicos de tejido son promotores de cardiomiocitos.

Preferiblemente, los promotores específicos de tejido son promotores de macrófagos.

Los ejemplos de promotores/potenciadores limitados a tejido adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos que son altamente activos en células tumorales tales como el promotor/potenciador del gen MUC1, del gen CEA o del gen del antígeno 5T4. Son ejemplos de promotores/potenciadores limitados temporalmente aquellos que son sensibles a la isquemia y/o hipoxia, tales como elementos de respuesta a la hipoxia o el promotor/potenciador de un gen grp78 o grp94. El promotor de α -fetoproteína (AFP) es también un promotor específico de tumor.

Preferiblemente, los promotores son específicos de tejido.

El término "específico de tejido" significa un promotor que no está limitado en su actividad a un solo tipo de tejido, pero que no obstante muestra selectividad porque puede ser activo en un grupo de tejidos y menos activo o latente en otro grupo. Es una característica deseable de los promotores que poseen una actividad relativamente baja en ausencia de los elementos potenciadores regulados por hipoxia activados. Un medio para conseguir esto es usar elementos "silenciadores" que suprimen la actividad de un promotor seleccionado en ausencia de hipoxia.

El nivel de expresión de una o más secuencias nucleotídicas de interés bajo el control de un promotor particular puede modularse manipulando la región promotora. Por ejemplo, diferentes dominios en una región promotora pueden poseer diferentes actividades reguladoras génicas. Los papeles de estas diferentes regiones se valoran típicamente usando constructos de vector que tienen diferentes variantes del promotor con regiones específicas eliminadas (es decir, análisis de delección). Este enfoque puede usarse para identificar, por ejemplo, la región más pequeña capaz de conferir especificidad de tejido o la región más pequeña que confiere sensibilidad a la hipoxia.

Una serie de promotores específicos de tejido, descritos anteriormente, pueden ser particularmente ventajosos para practicar la presente invención. En la mayoría de casos, estos promotores pueden aislarse como fragmentos de restricción-digestión convenientes adecuados para clonación en un vector seleccionado. Como alternativa, los fragmentos promotores pueden aislarse usando la reacción en cadena de la polimerasa. La clonación de los fragmentos amplificados puede facilitarse incorporando sitios de restricción al extremo 5' de los cebadores.

Preferiblemente, el promotor sensible a la isquemia es un promotor sensible a la isquemia limitado a tejido.

Preferiblemente, el promotor sensible a la isquemia limitado a tejido es un promotor específico de macrófagos limitado por represión.

Preferiblemente, el promotor sensible a la isquemia limitado a tejido es un promotor específico de endotelio.

Preferiblemente, el promotor sensible a la isquemia limitado a tejido es un promotor sensible a ILRE.

Por ejemplo, las proteínas reguladas por glucosa (grp) tales como grp78 y grp94 son proteínas altamente conservadas conocidas por inducirse por la falta de glucosa (Attenello y Lee 1984 Science 226 187-190). El gen grp78 se expresa a bajos niveles en la mayoría de tejidos sanos normales bajo la influencia de elementos promotores de nivel basal, pero tiene al menos dos "elementos reguladores inducibles por estrés" en 5' del elemento TATA (Attenello 1984 ibid; Gazit et al. 1995 Cancer Res. 55: 1660-1663). El enlazamiento con una secuencia de 632 pares de bases truncada del extremo 5' del promotor grp78 confiere una alta inducibilidad a la falta de glucosa a los genes informadores in vitro (Gazit et al. 1995 ibid). Además, esta secuencia promotora en vectores retrovéricos era capaz de activar un alto nivel de expresión de un gen informador en células tumorales de fibrosarcomas de murino, particularmente en sitios centrales relativamente isquémicos/fibróticos (Gazit et al. 1995 ibid).

Preferiblemente, los elementos promotores regulados fisiológicamente seleccionados son elementos promotores de choque térmico.

Preferiblemente, los elementos promotores regulados fisiológicamente son elementos de radiación.

Preferiblemente, los elementos promotores regulados fisiológicamente seleccionados son elementos de isquemia.

Potenciador

Además, cualquiera de estos promotores puede modificarse mediante la adición de secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo secuencias potenciadoras. Pueden usarse también promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

El término "potenciador" incluye una secuencia de ADN que se une a otros componentes proteicos del complejo de iniciación de la transcripción y facilita por tanto la iniciación de la transcripción dirigida por su promotor asociado.

Son otros ejemplos de promotores/potenciadores limitados a tejido adecuados aquellos que son altamente activos en células tumorales tales como el promotor/potenciador del gen MUC1, del gen CEA o del gen del antígeno 5T4. El promotor de α -fetoproteína (AFP) es también un promotor específico de tejido. Es una combinación de promotor-potenciador preferida una combinación de promotor/potenciador inmediato temprano principal (MIE) de citomegalovirus humano (hCMV).

Es un potenciador preferido un elemento de respuesta a la hipoxia (HRE).

HRE

Como se menciona anteriormente, la hipoxia es un potente regulador de la expresión génica en un amplio intervalo de diferentes tipos celulares, y actúa mediante la inducción de la actividad de factores de transcripción inducibles por hipoxia tales como el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1; Wang y Semenza 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 430), que se une a sitios de reconocimiento de ADN asociados, y los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) en diversos promotores génicos. Dachs et al. (1997 Nature Med. 5: 515) han usado una forma multimérica del HRE del gen de fosfoglicerato cinasa 1 de ratón (PGK-1) (Firth et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6496-6500) para controlar la expresión de genes tanto marcadores como terapéuticos por células de fibrosarcoma humano en respuesta a la hipoxia in vitro y en tumores sólidos in vivo (Dachs et al. ibid).

Se han encontrado también elementos potenciadores de respuesta a la hipoxia (HREE) asociados con una serie de genes que incluyen el gen de eritropoyetina (EPO) (Madan et al. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 3928; Semenza y Wang 1992 Mol. Cell. Biol. 1992 12: 5447-5454). Se han aislado otros HREE de regiones reguladoras tanto del gen de la enzima glicolítica muscular piruvato cinasa (PKM) (Takenaka et al. 1989 J. Biol. Chem. 264: 2363-2367), del gen de β -enolasa específica de músculo humano (ENO3; Peshavaria y Day 1991 Biochem. J. 275: 427-433) y del gen de endotelina 1 (ET-1) (Inoue et al. 1989 J. Biol. Chem. 264: 14954-14959).

Preferiblemente, el HRE seleccionado, por ejemplo, del elemento HRE de eritropoyetina (HREE1), del elemento HRE de piruvato cinasa muscular (PKM), del HRE de fosfoglicerato cinasa (PGK), del elemento HRE de β -enolasa (enolasa 3; ENO3), del elemento HRE de endotelina 1 (ET-1) y del elemento HRE de metalotioneína II (MTII).

Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones que comprenden el vector y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de los mismos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderán típicamente uno cualquiera o más de un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la materia farmacéutica y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co. (A. R.

Gennaro edit. 1985). La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede realizarse con respecto a la vía de administración pretendida y a la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, portador, excipiente y diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento o agente solubilizante adecuado.

5 Pueden proporcionarse en la composición farmacéutica conservantes, estabilizadores, tintes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Pueden usarse también antioxidantes y agentes de suspensión.

10 Puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependientes de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse usando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo, como un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o solución ingerible, o por vía parenteral en la que la composición se formula en forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para suministrarse por ambas vías.

15 Cuando la composición farmacéutica va a suministrarse por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería poder permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

20 Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de un supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo para espolvorear, mediante el uso de un parche dérmico, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa o tiza, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorante, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o trociscos que pueden formularse de manera convencional.

Administración

35 Típicamente, un facultativo determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual, y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular y la gravedad de la afección. Las dosificaciones siguientes son ejemplares del caso medio. Puede haber casos individuales, por supuesto, en que se justifiquen intervalos de dosificación mayores o menores.

40 Las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse por vía oral. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse mediante inyección directa. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse por vía tópica. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse por inhalación. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse también mediante uno o más de los medios de administración parenteral, mucoso, intramuscular, intravenoso, subcutáneo, intraocular o transdérmico, y se formulan para dicha administración.

50 A modo de ejemplo adicional, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse de acuerdo con un régimen de 1 a 10 veces al día, tal como una o dos veces al día. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variarse y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y el periodo de acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y momento de la administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y el hospedador que esté experimentando la terapia.

55 El término "administrado" incluye también, pero sin limitación, el suministro por vía mucosa, por ejemplo, como pulverizador nasal o aerosol para inhalación o como solución ingerible y la vía parenteral en que el suministro es por una forma inyectable tal como, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

60 Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse mediante una o más de las siguientes vías: administración oral, inyección (tal como inyección directa), tópica, por inhalación, administración parenteral, administración mucosa, administración intramuscular, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraocular o administración transdérmica.

65

Enfermedades

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz del vector pueden usarse en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como los enumerados en el documento WO-A-98/09985. Por facilidad de referencia, se proporciona ahora parte de esta lista: enfermedad de Parkinson, complicaciones y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionada con SIDA, encefalopatía relacionada con VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de apoplejías, síndrome postpoliomelítico, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, seudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares y enfermedades, afecciones o trastornos relacionados con el sistema inmunitario y la inflamación de los sistemas nerviosos central y periféricos.

FIGURAS

La invención se describe solo a modo de ejemplo en que se hace referencia a las siguientes figuras:

la figura 1 es una representación esquemática de genomas de EIAV;

la figura 2 da la secuencia plasmídica total de pONY8.1G;

la figura 3 da la secuencia plasmídica total de pONY8.4ZCG;

la figura 4 da la secuencia plasmídica total de pONY8.4GCZ;

la figura 5 es una representación esquemática de la región U3 híbrida;

la figura 6 da la secuencia de la LTR híbrida;

la figura 7 da la secuencia de pONY8.1Zhyb;

la figura 8 es una representación esquemática de pONY8.1Zhyb;

la figura 9 es una representación esquemática de pONY8.1ZCG y pONY8.0G;

la figura 10 es una representación gráfica que muestra la eficacia de transducción relativa de pONY8.1ZCG y pONY8.0G en presencia y ausencia de Rev;

la figura 11 muestra la secuencia completa de pONY8.4TCOG;

la figura 12 muestra la secuencia completa de pONY8.4TsynCOG/pONY8.4TsynCOG1;

la figura 13 es una representación esquemática de pONY8.4TsynCOG/pONY8.4TsynCOG1;

la figura 14 es una representación esquemática de un ejemplo de vector bicistrónico regulado por tetraciclina;

la figura 15 muestra el análisis de uso de codón del gen TetR. MH = genes altamente expresados en mamífero, WT = gen TetR de tipo silvestre, CO = gen TetR con optimización de codón. El uso de codón se ha alterado de tal modo que se parezca más estrechamente al de los genes de mamífero altamente expresados;

la figura 16 muestra el alineamiento de secuencias del gen represor de Tet de tipo silvestre y con optimización de codones. Las secuencias son idénticas al 71% a nivel nucleotídico (mayor tramo de homología 13 pb);

la figura 17 muestra que el TetR con optimización de codones permite la expresión de GFP en ausencia de dox 10 veces menos que en presencia de dox. Esta diferencia es significativamente mayor que cuando se usan otros vectores, sugiriendo que pONY8.4TsynCOG permite un mejor control de la represión;

la figura 18 muestra la reversibilidad de la expresión génica regulada por Tet de vectores que contienen TetR con optimización de codones;

la figura 19 muestra el transcurso temporal de expresión de GFP después de la adición de doxiciclina;

la figura 20 muestra la expresión de LTR alternativas;

la figura 21 es una representación esquemática de la modificación del vector bicistrónico regulado por Tet que incorpora una segunda copia del gen represor de Tet; y

5 la figura 22 muestra los títulos víricos de los vectores pONY8.4 y pONY8.7 con y sin Rev presente. La expresión de pONY8.4 y pONY8.7 es independiente de Rev.

Ejemplo 1 - pONY8.4

10 La serie de vectores pONY8.4 tiene una serie de modificaciones que les posibilitan funcionar como parte de un sistema de vector transitorio o estable totalmente independiente de proteínas accesorias, sin efecto perjudicial sobre el título. Los genomas de vector lentivírico convencionales requerían la presencia de la proteína vírica rev en las células productoras (transitorias o estables) para obtener títulos adecuados. Esto incluye los sistemas de vector HTV actual así como los vectores de EIAV iniciales. Hay 4 modificaciones cuando se comparan con la serie de vectores pONY8.1, estas son:

15 a) Todos los motivos ATG que derivan de gag y forman parte de la señal de empaquetamiento se han modificado para leer ATTG. Esto permite la inserción de un marco de lectura abierto que puede activarse por un promotor en la LTR.

20 b) La longitud del genoma, concretamente la distancia entre las regiones R, es menor que la observada en el virus silvestre (7,9 kb).

25 c) La región 3' U3 se ha modificado para incluir secuencias de la región U3 del virus de leucemia Moloney (MLV) de modo que, tras la transducción, puede activar un segundo marco de lectura abierto (ORF) además del módulo interno. En este ejemplo, los inventores tienen MLV, pero este podría ser cualquier promotor.

30 d) El vector contiene una secuencia nucleotídica ligada operativamente con la LTR vírica, en la que dicha secuencia nucleotídica está en 5' de un promotor interno y en la que dicha secuencia nucleotídica codifica un polipéptido o fragmento del mismo.

35 En conjunto, estas modificaciones permiten la producción de un sistema de suministro vírico sin la necesidad de proteínas accesorias y solo un 10% de la secuencia vírica original se integra en la célula diana. Estos factores son importantes para futuras consideraciones de seguridad en términos de respuesta inmunitaria y probabilidad de generación de virus competentes de replicación. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre la modificación de LTR en los documentos de los inventores WO 96/37623 y WO 98/17816.

40 La figura 1 es una representación esquemática de genomas de EIAV. Estos pueden usarse para transfección de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Tras la transfección, se copiará la 3' LTR a la 5' LTR. La figura 2 da la secuencia plasmídica total de pONY8.1G. La figura 3 da la secuencia plasmídica total de pONY8.4ZCG. La figura 4 da la secuencia plasmídica total de pONY8.4GCZ. La figura 5 es una representación esquemática de la región U3 híbrida. La figura 6 da la secuencia de la LTR híbrida.

Ejemplo 2 - Construcción de vectores de LTR híbridos de EIAV/MLV

45 Se llevó a cabo la PCR como sigue:

Producto A = cebadores KM001 + KM003, con pONY8.1Z como diana.

50 Producto B = cebadores KM004 + KM005, con pHIT111 como diana.

Producto C = cebadores KM006 + KM002, con pONY8.1Z como diana.

55 Se purificaron en gel los productos de PCR (A, B y C). Se configuró una reacción de PCR usando el producto A y B (con los cebadores KM001 y KM005), dando el producto D. Se configuró una reacción de PCR usando el producto B y C (con los cebadores KM004 y KM002), dando el producto E. Se purificaron en gel los productos D y E y se usaron en una reacción de PCR como dianas con los cebadores KM001 y KM002, dando el producto F. Se purificó en gel el producto F de PCR (aproximadamente 1 kb). Se cortó entonces este con Sap I y se subclonó en pONY8.1Z cortado con Sap I. Esto dio el vector pONY8.1Zhyb mostrado en las figuras 7 y 8. La 3' LTR de EIAV se ha reemplazado ahora por una LTR híbrida de EIAV/MLV. La U3 de EIAV se ha reemplazado casi por la región U3 de MLV. Las secuencias 5' U3 de EIAV de 3' LTR se han retenido, ya que estas comprenden el sitio att, es decir las secuencias necesarias para integración.

60 Se muestran a continuación las secuencias cebadoras:

65

U3 híbrido de EIAV/MLV

KM001

5 CAAAGCATGCCTGCAGGAATTCG

KM002

GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAG

10

KM003

GCCAAACCTACAGGTGGGGTC

TTTCATTATAAAACCCCTCATAAAAACCCACAG

KM004

15 CTGTGGGGTTTTTATGAGGGGTTTTATAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGG C

KM005

GAAGGGACTCAGACCGCAGAATCTGAGTGCCCCCGAGTGAGGGGTTGTGGGC TCT

20 KM006

AGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGG

GCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTC

Secuencia del producto de PCR final.

25 PPT/U3 de EIAV

CAAAGCATGCCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAATTGGA

AGAGCTTTAAATCCTGGCACATCTCATGTATCAATGCCTCAGTATGTTTAGAAA

AACAAGGGGGGAACTGTGGGGTTTTTATGAGGGGTTTTATAA

U3 de MLV

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCA

AGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGA

ACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTC

CTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACA

GGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTC

CCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAG

GGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGT

TCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCC

ACAACCCCTCACTCGGG

30

U3 de MLV/ R/U5 de EIAV

**GGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTT
 TGTAATAAATAAATTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTTCGAGAT
 CCTACAGAGCTCATGCCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAA
 ATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
 AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC
 TGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC
 AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCA
 CTGACTCGCTGCGCTC**

Ejemplo 3 – Enfermedad de Parkinson: identificación de los reguladores de la tirosina hidroxilasa

5 La tirosina hidroxilasa (TH) es una enzima necesaria para la síntesis de la dopamina. El factor de crecimiento nervioso se conoce por inducir la TH en los ganglios simpáticos, la médula suprarrenal, las neuronas simpáticas y las células cromafines de las ratas.

10 Un avance en la biología molecular con potencial terapéutico para tratar la enfermedad de Parkinson es la clonación de genes que codifican neurotrofinas y factores de crecimiento. Por ejemplo, se ha informado que el factor neurotrófico obtenido de la línea celular gial (GDNF) detiene la progresión de la degeneración en la sustancia negra inducida por la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) y se ha informado que la infusión del GDNF reduce los síntomas en los modelos de Parkinson en primates. La molécula de señalización Sonic hedgehog, conocida por desempeñar un papel importante en un número de contextos evolutivos, es capaz de inducir que las neuronas del mesencéfalo en desarrollo se diferencien con un fenotipo dopaminérgico in vitro. Estos resultados sugieren que podrían desarrollarse nuevas estrategias terapéuticas para identificar las moléculas que fomenten la diferenciación o supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

20 Una hipótesis alternativa es que las neuronas dopaminérgicas simplemente dejen de expresar los genes implicados en la producción de dopamina. En respuesta al GDNF, las células dopaminérgicas pueden, de hecho, estar activando la expresión de estos genes. Si se da el caso, entonces la identificación de las moléculas que activan la expresión de estos genes sería de una utilidad terapéutica considerable. Así, estas moléculas llevarían a conseguir el efecto terapéutico visto con el GDNF sin los efectos secundarios que conlleva la proliferación celular.

25 Un enfoque para identificar las moléculas que regulan la expresión de la tirosina hidroxilasa es:
 Estrategia

1. Se clona el promotor de la tirosina hidroxilasa, de modo que se monitoriza su actividad mediante un gen marcador adecuado, tal como una proteína verde fluorescente (GFP), un receptor del factor de crecimiento de baja afinidad (LNGFR) o la timidina quinasa (TK).
2. El casete promotor-marcador se introduce en una línea celular dopaminérgica, tal como 1RB3AN27 o neuronas primarias que pueden o no expresar de manera normal la tirosina hidroxilasa.
3. Las células marcadoras se transducen con una biblioteca adecuada (tal como un ADNc o ribozima) en un vector de
- 35 EIAV.
4. Opcionalmente, las células se cultivan en presencia del GDNF u otro factor de crecimiento.
5. Las células en las que la expresión génica del marcador está alterada, se aíslan, y la fracción de modulación se aísla del vector de la biblioteca mediante secuenciación.
6. Se identifica entonces la fracción diana a partir de la secuencia del inserto de la biblioteca.

40 Ejemplo 4

Se determinaron las dependencias relativas de REV de pONY8.1ZCG y pONYB.0G evaluando las eficacias de transducción en presencia y ausencia de REV (véase la figura 10). Esto se consiguió usando el vector pESYNREV. Se describen pESYNREV y pONY8.0Z en el documento WO 0179518. pONY8.0G deriva de pONY8.0Z, con GFP reemplazando a lacZ. pONY8.1ZCG deriva de pONY8.4ZCG, pero no tiene la LTR híbrida ni la secuencia ATTG completa. Se muestra en la figura 9 una representación esquemática de pONY8.1ZCG y pONY8.0G. Se evaluaron las eficacias de transducción de pONY8.1ZCG y pONY8.0G usando líneas celulares estándares en presencia y ausencia de REV.

50

Se midieron los niveles de ARN citoplasmático en las células productoras usando PCR cuantitativa y se normalizaron a 100 copias de β -actina celular. Se tomaron las medidas en el momento de recolección vírica y muestran que los niveles de ARN con la señal de empaquetamiento de EIAV se reducen en las células productoras de pONY8.0G en ausencia de REV. Esta diferencia no se observa en las células productoras de pONY8.1ZCG. Los datos muestran que el constructo pONY8.0G (+/- pESYNREV) es dependiente de REV, mientras que la eficacia de transducción de pONY8.1ZCG es independiente de REV.

Ejemplo 5

Se crearon vectores regulados por tetraciclina usando el vector pONY8.4 EIAV e incorporando el sistema de regulación por tetraciclina T-Rex para preparar pONY8.4TsynCoG1 (figuras 13 y 14). Se optimizaron los codones del promotor TetO₂ para expresión en células de mamífero (figura 15). Se usó GFP como gen informado para medir la expresión. Se mostró que los niveles de expresión de pONY8.4TsynCO G1 (figura 17) eran 10 veces mayores en presencia de doxiciclina (dox), que se une a TetR y alivia la represión de TetO₂, que en ausencia de la misma. La comparación de la expresión de GFP con los plásmidos originales pONY8.4ZCG y pONY8.4TCOG1 muestra que la represión en ausencia de dox se consigue solo con pONY8.4ZTsynCOG1.

Ejemplo 6

Se cultivaron células transducidas con vectores derivados de pONY8.4ZCG en medios con o sin dox, después se cambió para inducir o reprimir la expresión según fuera apropiado y después se cambió de nuevo. Se confirmó la "reversibilidad" de la expresión génica regulada por Tet a partir de los vectores que contienen TetR con optimización de codones. La expresión de GFP observada en las células cambiadas, como se muestra en la figura 18, tiene que alcanzar todavía los niveles máximos/mínimos observados en células que han crecido continuamente con o sin dox.

Ejemplo 7

Se preparó pONY8.4TsynnlsCOG1 en que TetR contenía una señal de localización nuclear (NLS):

5' GAC CCC AAG AAG AAG CGC AAG GTG TAA
D P K K K R K V detención

en su extremo C. La NLS se reseña que mejora la tasa de represión transcripcional tres veces (Ogueta et al.) al aumentar la concentración de TetR en el núcleo. Se enlazó la NLS con el extremo C-terminal para que no interfiriera con el extremo N de TetR, que es importante para unir TetO₂.

Se llevó a cabo un gráfico del transcurso temporal para determinar lo rápido que ocurre la expresión después de la adición de dox (la reducción de la expresión después de la retirada de dox medida por GFP está influida por el recambio de proteína). La figura 18 muestra que la expresión es casi máxima al cabo de 24 h de la adición de dox y que el TetR con optimización de codones marcado con NLS no tenía un nivel de expresión basal menor que la versión no marcada.

Ejemplo 8

La figura 19 muestra la expresión de GFP a partir de las LTR alternativas PGK y RSV en vectores pONY8.3, probando que las LTR híbridas alternativas pueden usarse también en vectores configurados como pONY8.4.

Ejemplo 9

El vector bicistrónico regulado por Tet puede modificarse para incorporar una segunda copia del gen represor de Tet (figura 20). La segunda copia está 3' de un IRES. Esta se expresará activamente cuando se transduzca en primer lugar una célula e inicialmente no contenga proteína TetR: a medida que aumentan los niveles de proteína, se anula la transcripción del gen X y la TetR localizada en 3' del IRES (sin tetraciclina ni doxiciclina presentes). Esta represión será más rápida en el constructo modificado mostrado aquí.

En ausencia de TetR activado por LTR, habría un bucle de realimentación resultante en el ciclamiento de la transcripción del gen X dependiendo de los niveles umbral de TetR. La presencia de una copia transcrita constitutivamente de TetR evita esto al mantener un nivel constante de TetR en la célula. En este ejemplo, el gen TetR en 3' del IRES es la versión de tipo silvestre que minimiza la posibilidad de que ocurra una recombinación indeseable, sin embargo, puede concebirse cualquier combinación de secuencias génicas codificantes de la proteína TetR (el NOI puede estar localizado también en 3' del IRES).

Ejemplo 10

Se comprobó la expresión de los vectores pONY8.4 y pONY8.7 en presencia y ausencia de Rev ensayando los títulos víricos de células infectadas. Los datos de virus mostrados no están concentrados y son de una sola placa. Se ensayó pONY8.7NCZ en una semana diferente que los demás vectores, por tanto a títulos ligeramente mayores. La ausencia de Rev no condujo a una diferencia significativa en el título de los vectores basados en pONY8.4 y pONY8.7, mostrando que son independientes de rev.

Resultarán evidentes para los expertos en la materia diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y sistema de la invención descritos sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas específicas, debería entenderse que la invención como se reivindica no debería limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. Es más, se pretende que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son evidentes para los expertos en biología molecular o campos relacionados.

REFERENCIAS

Bieri et al., (1999) *Nat. Biotechnol.*, 17: 1105-1108;

Li et al., (2000) *Nucleic Acids Research*, 28(13): 2605-2612;

Beger et al., (2001) *PNAS*, 98(1): 130-135;

Kestler et al., (1999) *Human Gene Ther.*, 10(10): 1619-32;

Winter et al., (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 433-55;

Hoogenboom, (1997) *Trends Biotechnol.*, 15: 62-70;

Parmley y Smith, (1988) *Gene*, 73: 305-18;

Lowman et al., (1991) *Biochemistry*, 30: 10832-8;

Nissim et al., (1994) *Embo J.*, 13: 692-8;

Yelamos et al., (1995) *Nature*, 376: 225-9;

Zaccolo et al., (1996) *J. Mol. Biol.*, 255: 589-603;

Leung et al., (1989) *Technique*, 1: 11-15;

Kowalczykowski et al., (1994) *Microbiol. Rev.*, 58: 401-65;

Stemmer, (1994) *Nature*, 370: 389-91;

Stemmer, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747-51;

Goodchild, JVK, (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, 284: 386-391;

"Molecular Biology and Biotechnology" (Ed. RA Meyers 1995 VCH Publishers Inc, pág. 831-8320);

"Retroviruses" (Ed. JM Coffin et al. 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press, pág. 683);

"Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, pág. 758-763;

Lewis et al., (1992) *EMBO. J.*, 11: 3053-3058;

Lewis et al., (1992) *EMBO. J.*, 11: 3053-3058;

Lewis y Emerman (1994) *J. Virol.*, 68: 510-516;

Yu et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 3194-3198;

Dougherty y Temin (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 1197-1201;

Hawley et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 2406-2410;

- Yee et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 9564-9568;
 Jolly et al., (1983) Nucleic Acids Res., 11: 1855-1872;
- 5 Emerman y Temin (1984) Cell, 39: 449-467;
 Herman y Coffin (1987) Science 236: 845-848;
 Clabough, et al., (1991) J. Virol., 65: 6242-51;
- 10 Derse y Newbold (1993) Virology, 194: 530-6;
 Maury, et al., (1994) Virology, 200: 632-42;
- 15 Martarano et al., (1994) J. Virol. 68: 3102-11;
 Senter et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 4842-4846;
 Mullen et al., (1994) Cancer Res., 54: 1503-1506;
- 20 Kerr et al., (1990) Cancer Immunol. Immunother., 31: 202-206;
 Borrelli et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 7572-7576;
- 25 Friedlos et al., (1997) J. Med. Chem. 40: 1270-1275;
 Chen et al., (1996) Cancer Res., 56: 1331-1340;
 Nature Biotechnology (1996) 14: 556;
- 30 Landau y Littman (1992) J. Virol., 66: 5110;
 Soneoka et al., (1995) Nucleic Acids Res., 23: 628-633;
- 35 Tomko et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 3352-2258;
 Wickham et al., (1993) Cell, 73: 309-319;
 Wickham et al., (1994) J. Cell Biol., 127: 257-264;
- 40 Hong et al., (1997) EMBO. 16: 2294-2306;
 Meyer, et al., (1991) J. Gen. Virol.. 72: 1031-1038;
- 45 Smith y Moss (1983) Gene, 25: 21-28;
 Upton, et al., (1986) J. Virology, 60: 920;
 Gershon, et al., (1989) J. Gen. Virol., 70: 525;
- 50 Weir, et al., (1983) J. Virol., 46: 530;
 Esposito, et al., (1984) Virology, 135: 561;
- 55 Hruby, et al., (1983) PNAS, 80: 3411;
 Kilpatrick, et al., (1985) Virology 143: 399;
 Binns, et al., (1988) J. Gen. Virol., 69: 1275;
- 60 Boyle, et al., (1987) Virology, 156: 355;
 Schnitzlein, et al., (1988) J. Virological Method, 20: 341;
- 65 Lytvyn, et al., (1992) J. Gen. Virol., 73: 3235-3240;

- Moss, B. (1991), *Science*, 252: 1662-7;
- Merchlinsky, M. et al., (1992) *Virology*, 190: 522-526;
- 5 Scheifflinger, F. et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 89: 9977-9981;
- Merchlinsky, M. et al., (1992) *Virology*, 190: 522-526;
- 10 Scheifflinger, F. et al., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 9977-9981;
- Pfleiderer et al., (1995) *J. General Virology*, 76: 2957-2962;
- Marshall (1998) *Nature Biotechnology*, 16: 129;
- 15 Wang y Sememnza (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4304;
- Firth et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6496;
- 20 Kallio, et al., (1998) *Embo J.*, 17: 6573-86;
- Semenza, G et al., (1994) *J. Biol. Chem.*, 269: 23757-63;
- Royds et al., (1998) *Mol. Pathol.*, 51: 55-61;
- 25 Matsui et al., (1999) *Cardiovasc. Res.*, 42: 104-12;
- Yan, et al., (1997) *J. Biol. Chem.*, 272: 4287-94;
- 30 Estes et al., (1995) *Exp. Cell Res.*, 220: 47-54;
- Gazit et al., (1995) *Cancer Res.*, 55: 1660;
- Matthias, et al., (1989) *NAR*, 17: 6418;
- 35 Carroll, MW, GW Wilkinson y K Lunstrom 2001 "Mammalian expression systems and vaccination" "Genetically Engineered Viruses" Ed: CJ Ring & ED Blair, pág.107-157 BIOS Scientific Oxford RU;
- Davison y Moss (1989) *J. Mol. Biol.*, 210: 749-769;
- 40 Attenello y Lee (1984) *Science*, 226: 187-190;
- Gazit et al., (1995) *Cancer Res.*, 55: 1660-1663;
- 45 Wang y Semenza (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 430;
- Dachs et al., (1997) *Nature Med.*, 5: 515;
- Firth et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6496-6500;
- 50 Madan et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 3928;
- Semenza y Wang (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12: 5447-5454;
- 55 Takenaka et al., (1989) *J. Biol. Chem.*, 264: 2363-2367;
- Peshavaria y Day (1991) *Biochem. J.* 275: 427-433;
- Inoue et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 14954-14959;
- 60 O'Hare, M. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(2): 646-51;
- Gillett et al., (1994) *Cancer Res.*, 54(7): 1812-7;
- 65 Yu et al., (2001) *Nature*, 411(6841): 1017-21;
- Stirling y Chung (2000) *Eur. Respir. J.*, 16(6): 1158-74;

- Weltman y Karim (2000) *Expert Opin. Investig. Drugs* 9(3): 491-6;
- Cai, H. et al., (2001) *Nat. Neurosci.*, 4(3): 233-4;
- 5 Vigneri y Wang (2001) *Nat. Med.*, 7(2): 228-34;
- Gorre et al., (3 de agosto de 2001) *Science*; 293(5531): 876-80;
- 10 McCormick (19 de julio de 2001) *Nature*; 412(6844): 281-2;
- Jahagirdar et al., (mayo de 2001) *Exp. Hematol.*; 29(5): 543-56;
- Sillaber et al., (15 de marzo de 2000) *Blood*; 95(6): 2118-25;
- 15 Liu et al., (marzo de 1996) *Mol. Cell Biol.*; 16(3): 998-1005;
- Arlinghaus (1998) *Crit. Rev. Oncog.*, 9(1): 1-18;
- 20 Shah et al., (abril de 1991) *Mol. Cell Biol.*; 11(4): 1854-60;
- Zhu et al., (11 de diciembre de 1990) *Nucleic Acids Res.*; 18(23): 7119-7125;
- Collins et al., (agosto de 1987) *Mol. Cell Biol.*; 7(8): 2870-2876;
- 25 Voncken et al., (noviembre de 1998) *Int. J. Mol. Med.*; 2(5): 577-583;
- Voncken et al., (10 de marzo de de 1995) *Cell*; 80(5): 719-728;
- Voncken et al., (16 de abril de 1998) *Oncogene*; 16(15): 2029-2032;
- 30 Wetzler et al., (octubre de 1993) *J. Clin. Invest.*; 92(4): 1925-1939;
- Perkins et al., (1 de febrero de 2000) *Blood*; 95(3): 1014-22;
- 35 Porosnicu et al., (mayo de 2001) *Leukemia*; 15(5): 772-778;
- Kwong y Todd, (1 de mayo de 1997) *Blood*; 89(9): 3487-8;
- 40 Puccetti et al., (1 de julio de 2000) *Cancer Res.* 60(13): 3409-3413;
- Andrews y Collins, (octubre de 1987) *Leukemia*; 1(10): 718-24;
- Dalgaard (1957) *Acta. Med. Scand.*, 328: 1-255;
- 45 Bacolla et al., (25 de mayo de 2001) *J. Biol. Chem.*; 276(21): 18597-604;
- Arnaout (2001) *Annu. Rev. Med.*, 52: 93-123;
- 50 Calvet y Grantham (marzo de 2001) *Semin. Nephrol.* 21(2): 107-23;
- Boletta et al., (noviembre de 2000) *Mol. Cell.*; 6(5): 1267-73;
- Grantham (julio de 2001) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*; 10(4): 533-42;
- 55 Arnould et al., (mayo de 1999) *Mol. Cell Biol.*; 19(5): 3423-34;
- Pugh et al., (marzo de 1995) *Kidney Int.*; 47(3): 774-81;
- 60 Richard et al., (11 de marzo de 1998) *J. Clin. Invest.*; 101(5): 935-9;
- Ibraghimov-Beskrovnyaya et al., (10 de junio de 1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(12): 6397-402;
- Kim (15 de febrero de 2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1731-6;
- 65 Pey et al., (noviembre-diciembre de 1999) *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 35(10): 571-9;

Miskin et al., (1998 y 2000) *Science*, 281: 562-565; *J. Virol.* 74: 9412-9420;

Powell et al., *J. Virol.*, 70: 8527-33;

5 Tait et al., *J. Biol. Chem.*, 275: 34656-64;

O'Hare, M. J. et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98(2): 646-51;

Cai, H. et al., (2001) *Nat. Neurosci.*, 4(3): 233-4;

10

Emmons SW, Somlo S. (23 de septiembre de 1999) *Nature*, 401(6751): 339-40.

REIVINDICACIONES

1. Un genoma de vector multicistrónico derivable de un lentivirus para uso en un sistema de producción lentivírico independiente de rev para producir una partícula de vector derivada de lentivirus, comprendiendo dicho genoma una señal de empaquetamiento, un marco de lectura abierto (ORF) heterólogo en 3' de una LTR vírica y en 5' de un promotor, en el que el promotor controla la expresión de al menos un nucleótido de interés (NOI) en 3' útil en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, y en el que el ORF heterólogo está ligado operativamente con la LTR; en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen auxiliar rev está alterada de tal modo que dicho gen auxiliar es incapaz de codificar la proteína auxiliar funcional, o se retira del genoma del vector lentivírico, y en el que el elemento de respuesta a Rev (RRE) está alterado de tal modo que dicho RRE no es funcional, o se retira del genoma de vector lentivírico, y en el que el vector lentivírico es un vector lentivírico autoinactivante.
2. El genoma de vector de la reivindicación 1, en el que el NOI es útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.
3. El genoma de vector de la reivindicación 2 en el que el NOI está implicado en la síntesis de la dopamina.
4. El genoma de vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el NOI codifica uno o más de la tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidrolasa 1, aminoácido aromático DOPA-descarboxilasa o el transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (VMAT2).
5. El genoma de vector según la reivindicación 1 en el que el NOI codifica un factor capaz de bloquear o inhibir la degeneración del sistema nigroestriatal.
6. El genoma de vector según la reivindicación 5 en el que el factor es un factor neurotrófico.
7. El genoma de vector según la reivindicación 5 en el que el factor es un factor neurotrófico obtenido de la línea celular gial (GDNF) o de un factor neurotrófico obtenido del cerebro (BDNF).
8. El genoma de vector según la reivindicación 1 en el que el NOI codifica un factor neuroprotector.
9. El genoma de vector de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ORF heterólogo es un resto informador o marcador seleccionable.
10. El genoma de vector de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ORF heterólogo codifica un gen modulador.
11. El genoma de vector de la reivindicación 10, en el que el gen modulador se selecciona de represores de tetraciclina tales como TetR y transactivadores controlados por tetraciclina tales como tTA y rTA.
12. El genoma de vector según la reivindicación 11, en el que el represor de tetraciclina tiene optimización de codones para expresión en una célula de mamífero.
13. El genoma de vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el genoma de vector es derivable de un vector lentivírico no de primate.
14. El genoma de vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el genoma de vector es derivable de un lentivirus seleccionado del grupo consistente en HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, BIV, EIAV, CAEV, MVV y vector lentivírico visna.
15. El genoma de vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el genoma de vector comprende una secuencia de tramo central de polipurina (cPPT).
16. El genoma de vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el genoma de vector comprende un elemento regulador postranscripcional o un elemento traduccional.
17. El genoma de vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que todos los motivos ATG que derivan de gag y forman parte de la señal de empaquetamiento se han modificado para leer ATTG.
18. El genoma de vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el genoma de vector es bicistrónico, tricistrónico o tetracistrónico.
19. Un sistema de producción de vector lentivírico para producir una partícula de vector derivada de lentivirus, comprendiendo dicho sistema un conjunto de secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes del genoma de vector incluyendo el genoma de vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, proteínas Gag y Pol y proteína Env o un sustituto funcional de las mismas, y en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el

gen auxiliar rev está alterada de tal modo que dicho gen auxiliar es incapaz de codificar la proteína auxiliar funcional, o no está presente en el sistema de producción de vector lentivírico y no se suministra en trans, y el RRE está alterado de tal modo que dicho RRE no es funcional, o no está presente en el sistema de producción de vector lentivírico, y no se suministra en trans.

5 20. El sistema de producción según la reivindicación 19, en el que el conjunto de secuencias de ácido nucleico comprende tres constructos de ADN que codifican (i) el genoma de vector lentivírico, (ii) Gag y Pol y (iii) Env.

10 21. El sistema de producción según las reivindicaciones 19 o 20, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica Gag y Pol tiene optimización de codones.

15 22. El sistema de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que las secuencias de ácido nucleico que codifican al menos uno de los genes auxiliares vpr, vif, tat y nef, o genes auxiliares análogos, del lentivirus del que derivan dichas partículas, están también alteradas de tal modo que dichos genes auxiliares son incapaces de codificar las proteínas auxiliares funcionales, o se retiran del sistema.

20 23. Un constructo de ADN para uso en el sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, codificando dicho constructo de ADN un genoma de vector de ARN empaquetable como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

24. Un conjunto de constructos de ADN que comprende el constructo de ADN según la reivindicación 23 y un constructo de ADN que codifica Gag y Pol como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21.

25 25. El conjunto de constructos de ADN según la reivindicación 24, que comprende adicionalmente un constructo de ADN que codifica Env o un sustituto funcional de la misma.

30 26. Un proceso para preparar una partícula de vector lentivírico que comprende introducir un conjunto de secuencias de ácido nucleico o constructos de ADN como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 en una célula hospedadora, y obtener una partícula de vector lentivírico.

27. Una partícula de vector lentivírico producida mediante el sistema, constructo de ADN o conjunto de constructos de ADN o proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, 25 y 26.

35 28. Una partícula de vector derivado de lentivirus que comprende un genoma de vector como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, proteínas Gag y Pol y proteína Env, o un sustituto funcional de las mismas.

29. Una célula transducida con la partícula de vector lentivírico de la reivindicación 27 o 28 o un constructo de ADN o un conjunto de constructos de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25.

40 30. Una partícula de vector lentivírico de la reivindicación 27 o 28 o un constructo de ADN o un conjunto de constructos de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 o una célula de la reivindicación 29 para uso en medicina.

45 31. Una composición farmacéutica que comprende el genoma de vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, el sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, el constructo de ADN o conjunto de constructos de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, una partícula de las reivindicaciones 27 o 28 o una célula de la reivindicación 29, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 32. Uso de una partícula de vector lentivírico de la reivindicación 27 o 28, o un constructo de ADN o conjunto de constructos de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, o una célula de la reivindicación 29, para la preparación de un medicamento para suministrar un NOI a un sitio diana necesitado del mismo.

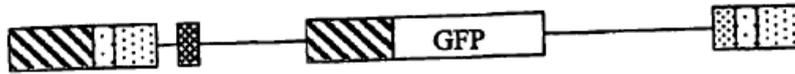
55 33. El uso de la reivindicación 32, en el que el medicamento es para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, tal como la enfermedad de Parkinson.

34. Un sistema de suministro en forma de una partícula de vector lentivírico de la reivindicación 27 o 28, o un constructo de ADN o conjunto de constructos de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, o una célula de la reivindicación 29, para uso en medicina.

Fig 1

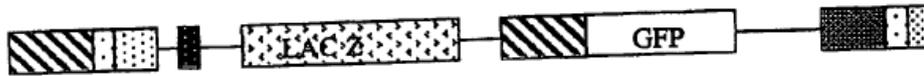
Tamaño (kb)

pONY8.1 G



2,6

pONY8.4ZCG



6,1

pONY8.GCZ



6,1



promotor de CMV



U3 de EIAV



región R de EIAV



región U5 de EIAV



señal de empaquetamiento



señal de empaquetamiento modificada



U3 hibrida

Figura 2

AGATCTTGAATAATAAAATGIGTGTGTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTCCGC
 GACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTATTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAA
 AAATTGATATTTGAAAATATGGCATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAAC
 TGATATCGCCATTTTCCAAAAGTGATTTTGGGCATACGCGATACTGGCGATAGCCCT
 TATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTC
 GCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGG
 CGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCC
 ATTAGCCATATTATTCAATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCA
 TACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCC
 ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
 GCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAAT
 AGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
 CGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGG
 ATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACTGCGATCGCCCGCC
 CCGTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGCTGAAAAGG
 CCTTTGTAATAAATAAATTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTTCGAGATC
 CTACAGTTGGCGCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGGCGCAGACCTACCTGTTGAACCTGG
 CTGATCGTAGGATCCCCGGGACAGCAGAGGAGAAGTTACAGAAATCTTCTGGAGGTGTT
 CTGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATTGGGAGACCCCTTGACATTGGAGCAAGGC
 G
 CTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAAATTAAGTACTGGTAACTGT
 AATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTCATGATACCAACTTTGTAAGAAAAGAAAGGAC
 TGGCAGCTGAGGGATGTCAATCCATGCTGGAAGATGTAAGTCAAGACGCTGTGAGGACAA
 GAAAGAGAGGCCCTTTGAAAGAACATGGTGGGCAATTTCTGCTGTAAAGATGGGCCCTCCAG
 ATTAATAATGTAGTAGATGGAAAGGCATCATTCAGCTCCTAAGAGCGAAAATATGAAAAG
 AAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAATATCTCTAGAAGTACTGAGTGC
 CCGGGCTGCAAGGAGTGGGGAGGCACGATGGCCGCTTTGGTCGAGGCGGATCCGGCCAT
 TAGCCATATTATTCAATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATA
 CGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCAT
 GTTACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATA
 GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
 CCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAATAG
 GGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC
 ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
 CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG
 TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT
 AGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT
 TTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACTGCGCCCAATTGACGC
 AAATGGGCGGTAGGCATGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAAACC
 GTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACTCCATAGAAGACACCGGGACC
 GATCCAGCCTCCGCGGCCCAAGCTTGTGGGATCCACCGGTCGCCACCATTGGTGTAGCAA
 GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCTTCTGGTTCGAGCTGGACGGGCGAGTAAA
 CGGCCACAAGTTTACGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC
 CCTGAAAGTTTCTGCAACACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCCAACCTCGTGACCAC
 CCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTTACGCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTT
 CTTCAAGTCCGCCATGCCGAAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGA
 CGGCAACTACAAGACCCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACAACCTGGTGAACCGCAT
 CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
 ACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG
 GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC

CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAACACTACCTGAGC
 ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAG
 TTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGC
 GACTCTAGAGTCGACCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCCGTGCAATTGGAA
 GAGCTTTAAA'TCCTGGCACATCTCATGTATCAATGCCTCAGTATGTTTAGAAAAACAAGGG
 GGAAGTGTAAAGCCTGGGGTTTTATGAGGGGTTTTATAAATGATTATAAGAGTAAAAAGAAAGTT
 GCTGATGCTCTCATAACCTTGTATAACCCAAAGGACTAGCTCATGTTGCTAGGCAACTAAA
 CCGCAATAACCGCATTTFGACGCGAGTTCGCCATFGGTFGACGCGTTAACTTCTGTTTT
 TACAGTATATAAGTGTGTATTCTGACAATTGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCC
 CTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCCTTTGTAATAAATATAAATCTCTACTCAGTCCCTGTC
 TCTAGTTTTGCTGTTCGAGATCCTACAGAGCTCATGCCTTGGCGTAATCATGGTCTATAGC
 TGTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCA
 TAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTCACATTAATTGCGTGTGCGT
 CACTGCCCGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
 GCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCTCTGCTCACTGACTCGC
 TGCCTCGGTCTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
 TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAG
 GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAGC
 AGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA
 TACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCGGCTTA
 CCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
 GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
 CCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCCGTAA
 GACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
 TAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAG
 TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT
 GATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA
 CGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTC
 AGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
 CCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAA
 CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT
 TTCGTTCAATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTTAGATAAAGTACGATACGGGAGGCT
 TACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATAACGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATT
 TATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGTCTGCAACTTTAT
 CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTA
 ATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTG
 GTATGGCTTCAATCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGT
 TGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCG
 CAGTGTIATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCG
 TAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGC
 GCGACCGAGTTGCTCTTTCGGCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAA
 CTTTAAAAAGTGTCTCATATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTAC
 CGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTTCGTCCACCCAACTGATCTTACAGCATCTT
 TACTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGG
 GAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAA
 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAATTTGAATGTATTTAGAAAAATA
 AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTAAATTTGTAAGCGTTAA
 TATTTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGC
 CGAAATCGGCAAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGT
 TCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAA
 AACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAAATCAAGTTTTTTGGG
 GTCGAGGTGCCGTAAAAGCACTAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTG
 ACGGGGAAAGCCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGC

Figura 3

AGATCTTGAATAATAAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTCCGC
 GACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTATTCGCGGATAGAGATGGCGATATTGGAA
 AAATTGATATTTGAAAATATGGCATAATTGAAAATGTGCGCGATGTGAGTTTCTGTGTAAC
 TGATATCGCCATTTTCCAAAAGTGATTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCT
 TATATCGTITACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTC
 GCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGG
 CGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCC
 ATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCA
 TAGCTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCC
 ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAATCAATTACGGGGTCAATGGGAGTT
 TAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTTGGCTGACC
 GCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
 CGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGG
 ATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTGCGTAACTGCGATCGCCCGCC
 CCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGG
 CCTTTGTAATAAATATAATTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTGAGATC
 CTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGGCGACACCCTACCTGTTGAAACCTGG
 CTGATCGTAGATCCCGGGACAGCAGAGGAGAACCTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTC
 CTGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATTGGGAGACCCTTTGACATTGGAGCAAGGC
G
 CTCAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAATTAACACTGGTAACTGT
 AATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTCAATTGATACCAACTTTGTAAGAAAGAAAAGGA
 CTGGCAGCTGAGGGATTGTCAATCCATTGCTGGAAGATTGTAACCTCAGACGCTGTCAGGA
 CAAAGAAAGAGAGGCCCTTTGAAAGAACATTGGTGGCAATTTCTGCTGTAAAGATTGGGCC
 TCCAGATTAATAATTGTAGTAGATTGGAAAGCATCATTCCAGCTCCTAAGAGCGAAATA
 TTGAAAGAAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAATATCTCTAGAACT
 AGTGGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTCAGCTGCTCGAGGATCTGCGG
 ATCCGGGAATTCCCAAGTCTCAGGATCCACCATGGGGGATCCCGTCTGTTTACAACGTC
 GTGACTGGGAAAACCTGGCGTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCG
 CCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGGCGAGCC
 TGAATGGCQAATGGCCCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGC
 TGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACGTGCTGCTCCCTCAAACCTGGCAGATGCACG
 GTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCGTTTTG
 TTCCACGGAGAATCCGACGGGTGTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGC
 TACAGGAAGGCCAGACGCGAATTAATTTTATGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGT
 GCAACGGGCGCTGGGTGCTTACGGCCAGGACAGTCTGTTTGGCGTCTGAAATTTGACCTGA
 GCGCATTTTACGCGCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGTCTGCGTTGGAGTGACG
 GCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTCCGTTGACGTTCTG
 TGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATG
 ATTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACC
 TACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTT
 TCGGCGGTGAAATTAATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCAACTACGTTGA
 ACGTCAAAAACCGAACTGTGGAGCGCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGGCGTGGTTG
 AACTGCACACCGCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTCGGTTTTCCGCG
 AGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGTAACGGCAAGCCGTTGCTGATTTCGAGGCG
 TTAACCGTACAGACATCATCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGC
 AGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAATTTAACCGCGTGGCGTTCGCAATTATCCGA
 ACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCA
 ATATTGAAACCCACGGCATGGTGCATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTAC
 CGCGATGAGCGAAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAAATCACCCGAGTGTGA
 TCATCTGGTCTGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGTAATCACGACCGCGTGTATCGCT

GGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAAGCGGCGGAGCCGACACCA
CGGCCACCGATATTTATTTGCCCGATGTACCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGG
CTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGA
TCCTTTGCGAATACGCCACCGGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGC
AGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGT
CGCTGATTAATATGATGAAAACGGCAACCCCGTGGTTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCG
ATACGCCGAACGATCGCCAGTTCGTATGAAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCCGACGCGCG
ATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCGGTTTATCCGGGC
AAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACT
GGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTGCTC
CACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAAC
TCTGGCTCACAGTACCGTAGTGCAACCGAACCGGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCA
TCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCGCCCGCT
CCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATA
AGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATAAAA
AACCACTCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACT
GCGTAAAGTGAAGCGACCCGCAITGACCCTAACGCCCTGGGTGAAACGCTGGAAGGCGGCG
GCCATTACCAGGCCGAAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGG
TGCTGATTACGACCGCTCACCGGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGA
AAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGA
GGGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGC
GGGTAACCTGGCTGGATTAGGGCCGCAAGAAAATATCCCGACCGCCTTACTGCCGCT
GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTGACAGATGTATACCCCGTACGTTCTCCCGAGCG
AAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAAATATGGCCACACCAAGTGGCGCGGCG
ACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACAGCCATCGCC
ATCTGCTGCACGCGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTG
GTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAAATCCAGCTGAGCGCCGGTCTGCT
ACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACCGGGCAGGGGGGATCCGCGA
TCCGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGCAGCAGCA
GAAATATGCAAAGCTAGAAGTGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAGTGGGGAGGCAGAT
G
GCCGCTTTGGTCGAGGCGGATCCGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATA
AATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTA
TATTGGCTCATGTCCAACAATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTTACTAGTTATTAATA
GTAATCAATTACGGGTCATTAGTTCAATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT
TACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAAAT
GACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTA
TTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
TATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATG
GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGGTGTATGCG
GTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCT
CCACCCATTGACGTCATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAA
ATGTGCTAACAACTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCATGTACGGTGGGAGGT
CTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAAACCGTCAAGTTCGCTGGAGACGCCATCCACGCTG
TTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCAAGCTTGTGG
GATCCACCGGTCCGACCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCC
ATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCCGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTTCATCTGCACCACCGCAAGCTG
CCCGTGCCTTGGCCACCCCTCGTGAACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCG
TACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
TTCGAGGGCGACACCTTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
GGCAACATCTTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATG
GCCGACAAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
C
GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGCTG
CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCGCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
AAGCGCATCAATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATG

GACGAGCTGTACAAGTAAAAGCGGCCGCGACTCTAGCCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT
 ATCGATAACGTCGAATTGGAAGAGCTTTAAATCCTGGCACATCTCATGTATCAATGCCTC
 AGTATGTTTTAGAAAAACAAGGGGGAACTGTGGGGTTTTATGAGGGGTTTTATAAAAAAT
 GAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAAGTAAACGCCATTTTGCAGGCATG
 GAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAG
 C
 TGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAG
 AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCC
 CGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGA
 GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCECAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGA
 ACTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATA
 AAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGGCAGCTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTC
 TGCTGGGCTGAAAAGGCCCTTTGTAATAAATATAATTCCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGT
 TTGTCTGTTCGAGATCCTACAGAGCTCATGCCCTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTC
 CTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAAT
 GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
 CCGCTTCCAGTCCGGAAACCTGTGCGGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG
 GGAGAGGGCGTTTGGGTATTGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
 CGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
 CAGAAACAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAG
 GAACCGTAAAAAGGCCGCTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAAGATACCA
 GCGCTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCGCTTACCGGA
 TACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT
 ATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTT
 AGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACATATCGTCTGAGTCCAACCCGTAAGACACG
 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCG
 GTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTG
 GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCG
 GCAAACAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCA
 GAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGG
 ACGAAAATCAGTTAAGGGATTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGA
 TCTTTTAAATTAATAAAGATGAAATTTAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTTGGT
 CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATITCGT
 CATCCATAGTTGCTGACTCCCGTGTGTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
 CTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAG
 CAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCT
 CCATCCAGTCTATTAATITGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAAGTATGTTCCGCAATTAAGTT
 TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCGTCTGTTGGTATGG
 CTTCATTCAAGTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCA
 AAAAAGCGTTAGTCTCTCGTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAAGTTGGCCCGCAGTGT
 TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGAT
 GCITTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
 CGAGTGTCTTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
 AAGTGTCTATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGT
 TGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTT
 TCACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATA
 AGGGCGACACGAAAATGTTGAATACTCATACTCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTT
 ATCAGGGTTATTGTTCTCATGAGCGGATACATAATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
 TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCACCTAAAATTGTAAGCGTTAATATTTT
 GTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAAT
 CGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGT
 TTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGAAGTCCAAAGTCAAAGGGCGAAAAACCGT
 CTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
 GTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAAGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGG
 AAAGCCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGG

Figura 4

AGATCTTGAATAATAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTGCGC
 GACTAAATTCATGTGCGCGGATAGTGGTGTATCGCCGATAGAGATGGCGATATGGAA
 AAATTGATATTTGAAAATATGGCATATTTGAAAATGTGCGCGATGTGAGTTTCTGTGTAAC
 TGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCT
 TATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTC
 GCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGG
 CGACATCAAGCTGGCACATGGCCAAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCC
 ATTAGCCATATTAATTCATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCA
 TACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACAATTACCGCC
 ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACC
 GCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
 CGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTTTAGTATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGG
 ATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACTGCGATCGCCCGCC
 CCGTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGICTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGGGCACTCAGATTTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGG
 CCTTTGTAATAAATAAATTTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTTGTCTGTTGAGATC
 CTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTGG
 CTGATCGTAGGATCCCCGGGACAGCAGAGGAGAACTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTTT
 CTGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATTGGGAGACCCTTTGACATTGGAGCAAGGC
 G
 CTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAATTAACTACTGGTAACTGT
 AATTGGGGCGTAAGTCTAGTAGACTTATTTTCATTGATACCAACTTTGTAAAAGAAAAGGA
 CTGGCAGCTGAGGGATTGTCAATTCATTGCTGGAAGATTGTAACCTCAGACGCTGTGAGGA
 CAAGAAAAGAGAGCCCTTGAAAGAACATTGGTGGGCAATTTCTGCTGTAAAGATTGGGCC
 TCCAGATTAATAATTGTAGTAGATTGAAAAGGCATCATTCCAGCTCCTAAGAGCGAAAATA
 TTGAAAAGAAAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAATATCTCTAGAGTC
 GACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCACCGTCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
 T
 GTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
 CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT
 CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
 CGTGACGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGC
 CATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAA
 GACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 G
 CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACA
 G
 CCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGAT
 CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
 CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCT
 GAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGC
 CGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCTCTAGAAGTATGGG
 ATCCCCGGGCTGCAGGAGTGGGGAGGCACGATGGCCGCTTGGTTCGAGGCGGATCCGGC
 CATTAGCCATATTAATTCATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGC
 ATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGC
 CATGTTGACATTGATTATGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTC
 ATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGAC
 CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
 TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATITACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
 TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT

ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGGGTG
 GATAGCGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTT
 TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACTCCGCCCCATTGA
 CGCAAATGGGCGGTAGGCATGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGA
 ACCGTAGATCGOCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGG
 ACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCAAGCTTCAGCTGCTCGAAGATCTGCGGATCCGGGGAA
 TTCCCCAGTCTCAGGATCCACCATGGGGGATCCCGTCTTTTTACAACGTCTGACTGGGA
 AAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCCGACGCTGGCG
 TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA
 ATGGCGCTTTGCCTGGTITCCGGCACCAAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGGGA
 TCTTCTGTAGCCGATACTGTGCTGCTCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGC
 GCCATCTACACCAACGTAACTTACCTATCCCATACGGTCAATCCGCCGTTTTGTTCCACGGA
 GAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGG
 CCAGACGCGAATTAATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGAACGGGCG
 CTGGGTGGTTACGGCCAGGACAGTCTGTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTITF
 ACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCT
 GGAAGATCAGGATAITGTTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGCTCTCGTTGCTGCATAA
 ACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTAAATGATGATTTACGCCG
 CGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTAGATGTGCGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAAC
 AGTTTTCTTATGGCAGGGTGAACCGCAGGTGCGCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGA
 AATATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTTGAACTCGAAAA
 CCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCAGTGGTTGAACTGCACAC
 CGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCITGCGATGTGCGTTTTCCGCGAGGTGGCGAT
 TGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCA
 CGAGCATATCCTCTGCATGGTCAGGTGATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCT
 GCTGATGAAGCAGAACAACTTTAAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCATCCGCT
 GTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAAC
 CCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGCGATGAG
 CGAACCGGTAACCGGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTC
 GCTGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGGCGTGTATCGCTGGATCAAATC
 TGTGATCCTTCCCGCCCGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGGA
 TATTAFTTGGCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGCTGTGCCGAA
 ATGGTCCATCAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGA
 ATACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTTGCTAAATACTGGCAGGCGTTTTCG
 TCAGTATCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCTGCTGATTAA
 ATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCCGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAA
 CGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCGCATCCAGCGCT
 GACGGAAGCAAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAAACCATCGA
 AGTGACCAGCGAATACTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGC
 GCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTGCTCCACAAGGTAA
 ACAFTTGAATGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCAC
 AGTACGCGTAGTGCAAACCGAACCGGACCGCATGGTCAAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTG
 GCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCGCGTCCCACGCCAT
 CCCGATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCA
 ATTTAAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACCTGCT
 GACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTCACCGCTGGATAACGACATTTGGCGTAAGTGA
 AGCGACCCGCAITGACCCTAACGCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCA
 GGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGTGATGCGGTGCTGATTAC
 GACCGCTCACCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGAAAACCTACCG
 GATGATGGTGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACCC
 GCATCCGCGCGGATTTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTG
 GCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCTGTTTTGACCG
 CTGGGATCTGCCATTTGTCAGACATGTATAOCCCGTACGTTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCT
 GCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTTAGGCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTT
 CAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAAACCAAGCCATCGCCATCTGCTGCA
 CGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGA
 CTCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCACGCTGAGCGCCGCTGCTACCATACCA
 GTTGGTCTGGTGTCAAAAAATAATAAACCGGGCAGGGGGGATCCGCGATCCGGCTGTG

GAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCA
 AAGCATGCCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAATTGGAAGAGCTTT
 AAATCCTGGCACATCTCATGTATCAATGCCTCAGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGGAAC
 TGTGGGGTTTTTATGAGGGGTTTTATAAAAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAG
 CTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAG
 TTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTG
 GTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCA
 AACAGGATATCTGTGGTAAGCAAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCC
 CAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGGCCC
 AAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTC
 TGTTCGCGGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGG
 GCACTCAGATTCGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTTTGTAATAA
 ATATAATCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTGAGATCCTACAGAGCTCA
 TGCTTGGCGTAATCATGTGCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
 TCCACACAACATACGAGCGGAAGCATAAAAGTGTAAGCCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG
 CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAAACCTGTGCTG
 CCAGCTGCATTAATGAAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTC
 TTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATC
 AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA
 A
 CATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGT
 T
 TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGC
 CTCTCCTGTTCCGACCTTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTCGGGGAAG
 CGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTGCTC
 CAAGCTGGGTGTGTGCACGAACCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTTAA
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
 TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCC
 TAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC
 CTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
 TTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTAACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
 GATCTTPTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGT
 CATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
 ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA
 GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGT
 GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCG
 AGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGA
 GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
 AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
 CATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATC
 AAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCC
 GATCGTTGTACAGAAAGTAAAGTTGGCCGCAAGTATTCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCA
 TAATTTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAAC
 CAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACG
 GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGTCTCATCATTTGAAAAACGTTCTT
 GGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
 TGCACCCAACTGATCTTACGCACTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAC
 AGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA
 TACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCAITTTATCAGGGTTATIGTCTCATGAGCGGATA
 CATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
 AGTGCCACCTAAAATTGTAAGCGTTAATAATTTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAA
 ATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCCGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAA
 TAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAC
 GTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAA
 CCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCCAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCCT
 AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAGCCAACCTGGCTTATCGAAATTAAT
 ACGACTCACTATAGGGAGACCGGC

Figura 5

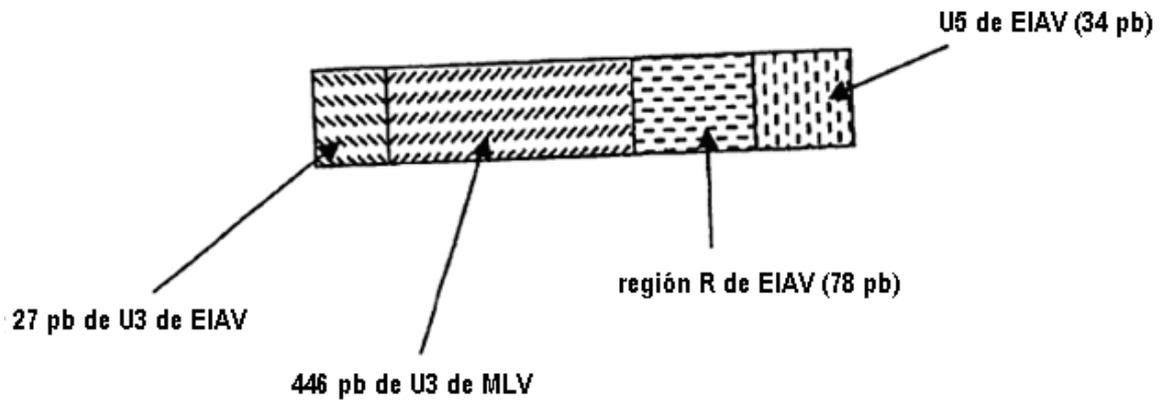


Figura 6

TGTGGGGTTTTTATGAGGGGTTTTATAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCT
AGCITTAAGTAAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTT
CAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGG
T
AAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAA
A
CAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCA
GATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCCAA
GGACCTGAAATGACCCCTGTGCCTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTG
TTCGCGGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGGGC
ACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTTTGTAAATAAAT

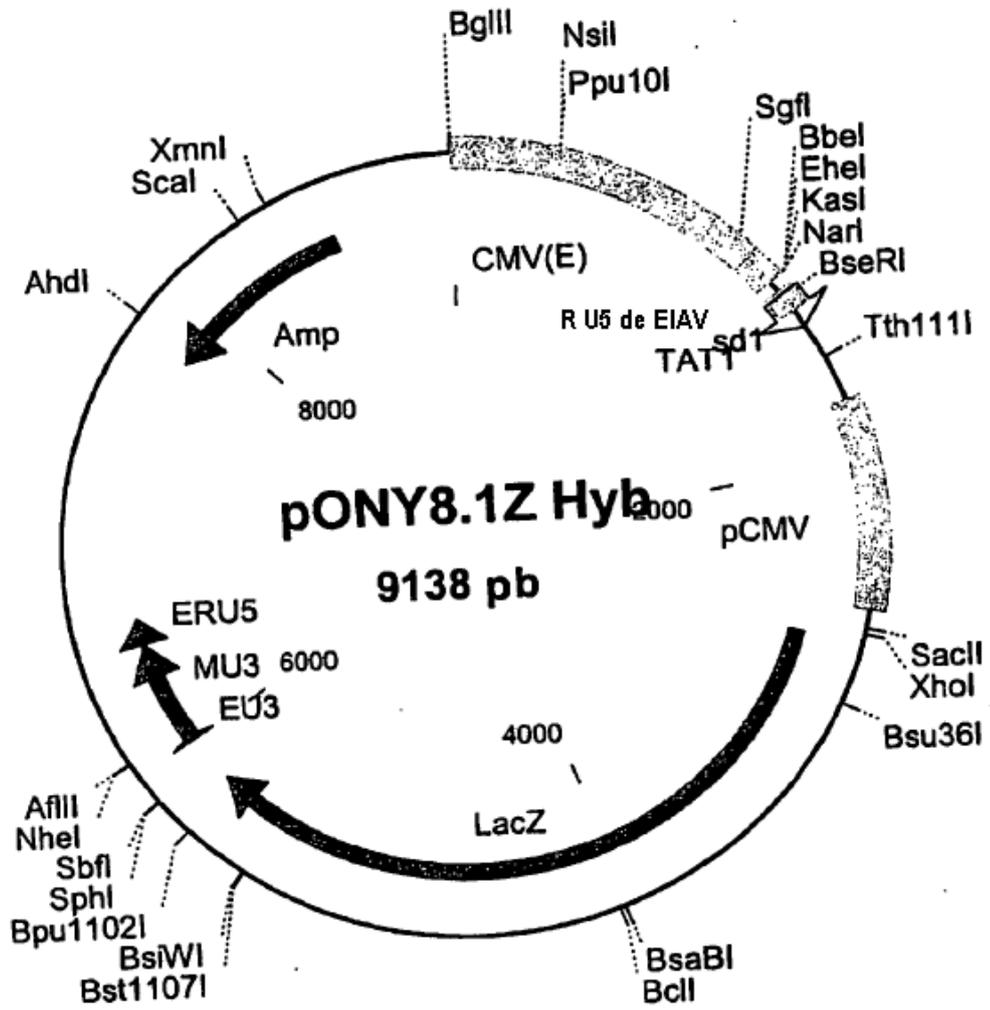
Figura 7

AGATCTTGAATAATAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTCGCCG
 ACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTTCATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAA
 AATTGATATTTGAAAATATGGCATATTTGAAAATGTCCCGATGTGAGTTTTCTGTGTAAGT
 ATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCTTA
 TATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTTCTGTGTGTCG
 CAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGG
 CGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCC
 ATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATA
 CGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATG
 TTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTACAGC
 CCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCC
 CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG
 GGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTA
 CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
 CGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTG
 GATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCAAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGT
 TTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTGTAACAACACTGCGATCGCCCCG
 CCCCCTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
 TCGTTTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGA
 AAAGGCCTTTGTAATAAATAAATCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTTGTCTGTTTGA
 GATCCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGA
 ACCTGGCTGATCGTAGGATCCCGGGACAGCAGAGGAGAAGTACAGAAAGTCTTCTGGA
 GGTGTTCTGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATTGGGAGACCCTTTGACATTGGA
 GCAAGGCGCTCAAGAAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAATTAACACT
 GGTAACTGTAATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTTCATGATACCAACTTTGTA
 AAAAGGACTGGCAGCTGAGGGATGTCATTCATTGCTGGAAGATGTAACCTCAGACGCTG
 TCAGGACAAGAAAGAGAGGCTTTGAAAGAACATGGTGGGCAATTTCTGCTGTAAGAT
 TGGCCTCCAGATTAATAATGTAGTAGATGGAAAGGCATCATTCCAGCTCCTAAGAGCGA
 AATATGAAAAGAAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAATATCTCTAGA
 ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAGTGGGGAGGCACGATGGCCGCTTTGGTCCGAG
 GCGGATCCGGCCATTAGCCATATTATTATTGCTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTAT
 TGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAA
 CATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTACAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAACTGGCCCGCC
 TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
 TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
 ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
 GTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG
 CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC
 AATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCAAAGTCTCCACCCCAATTGACGT
 CAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTGCTAACAACCTC
 CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCATGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGA
 GCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCA
 TAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCAAGCTTCAGCTGCTCGAGGAT
 CTGCGGATCCGGGGAATTCCCAGTCTCAGGATCCACCATGGGGGATCCCGTCTGTTTTA
 CAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCC
 CCCTTTCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAGCGATCGCCCTTCCCAACAG
 TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGC
 CGGAAAGCTGGCTGGAGTGGGATCTTCTGAGGCCGATACTGTCTGCTCCCTCAAAC
 TGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCATTACGGT
 CAATCCGCCGTTTTGTTCCACGGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGT
 TGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATATTTTTGATGGCGTTAACTCGG
 CGTTTCATCTGTGGTGCACGGGGCGCTGGGTCCGTTACGGCCAGGACAGTCTGTTTGGC
 GTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGG
 TGCTGCGTTGGAGTACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGG
 CATTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCAGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGT

TGCCACTCGCTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCTGTAAGTTTCAGATGT
 GCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAACGCAG
 GTCGCCAGCGGCACCGCGCTTTCGCGGGTGAATATCGATGAGCGTGGTGGTTATG
 CCGATCGCGTACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATC
 CCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAG
 CAGAAGCCTGCGATGTCGGTTTCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCT
 GAACGGCAAGCCGTTGCTGATTTCGAGGGGTTAACCGTACGAGCATCATCCTCTGCATG
 GTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAAC
 TTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGA
 CCGCTACGGGTATATGTTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAA
 TGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAAACGCG
 AATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTGCCTGGGGAATGAAT
 CAGGCCACGGCGCTAATCACGACGGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTCCGATCCTTCC
 CGCCCGGTGCGATGATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCC
 CGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCAT
 CAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCCC
 ACGCTACGGGTAAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTAT
 CCCCCTTACAGGGCGGCTTCTGCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGA
 TGAACCGCAACCCGTTGGTGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGAT
 CGCCAGTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTCGCGACCGCACGGCGCATCCAGCGCTGA
 CGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCGTTTATCCGGGCAACCATCGAA
 GTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGC
 GCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTGCTCCACAAAGT
 AAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGC
 TCACAGTACGCGTAGTGAACCGAACGGCAGCCGATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAG
 CGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCGCGCGCTCC
 CACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTGCATCGAGCTGGGTAATAA
 GCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTCTTTTACAGATGTGGATTGGCGATAAAAA
 ACAAGTCTGACCGCGCTGCGCGATCAGTTACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTG
 CGGTAAGTGAAGCGACCCGATTGACCCCTAACGCCTGGGTGGAACGCTGGAAGCGGC
 GGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAAGTGCACGGCAGATACACTTGTGAT
 GCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAG
 CCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAG
 TGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGT
 AGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTT
 ACTGCCGCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTGACAGATGTATACCCCGTACGT
 CTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCACAC
 CAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGA
 AACAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTT
 TCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATCCA
 GCTGAGCGCCGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGG
 GCAGGGGGATCCGCAGATCCGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGT
 CCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAGCATGCCTGCAGGAATTCGATATCAAG
 CTTATCGATACCGTCGAATTGGAAGAGCTTTAAATCCTGGCACATCTCATGTATCAATGC
 CTCAGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGGAACTGTGGGGTTTTTATGAGGGGTTTTATAAT
 GAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCAT
 GGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTTCAAGTCAAGGTCAGGAACAGATGGAACA
 GCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTTCCCGGCTCAGGGC
 CAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAAGCAGTTCC
 TGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGT
 TTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCC
 TTATTTGAACTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCGA
 GCTCAATAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAG
 TCCCTTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTTTGTAATAAATAAATTCTCTACTCAGTCCCTG
 TCTGATGTTGTCTGTTGAGATCCTACAGAGCTCATGCCTTGGCGTAATCATGGTCATA
 GCTGTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAG
 CATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG
 CTCACTGCCGCTTTCAGTCCGGAAAACCTGTGTCGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC

AACGCGGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGA
 CTGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA
 ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
 GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
 CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG
 GACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCGCTCTCCTGTTCCG
 ACCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
 TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCT
 GTGTGCACGAACCCCGTTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT
 GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT
 TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACG
 GCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
 GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
 TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAG
 ATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCT
 AAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
 TCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTTCCATCAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAA
 CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCC
 ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC
 AGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
 AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCBCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
 GTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAG
 GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGA
 TCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATA
 ATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCA
 AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGGTCAATACGG
 GATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG
 GGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
 TGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
 AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA
 TACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA
 CATATTTGAATGATTTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAA
 GTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATC
 AGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGA
 CCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACCGTG
 GACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAAC
 CATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTGGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTA
 AAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCAACCTGGCTTATCGAAATTAAT
 ACGACTCACTATAGGGAGACCGGC

Figura 8



pONY8.1ZCG



pONY8.0G

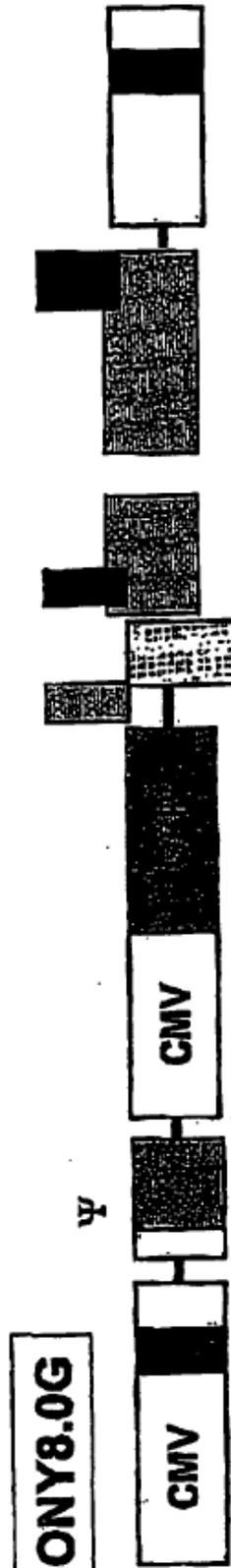


Figura 9

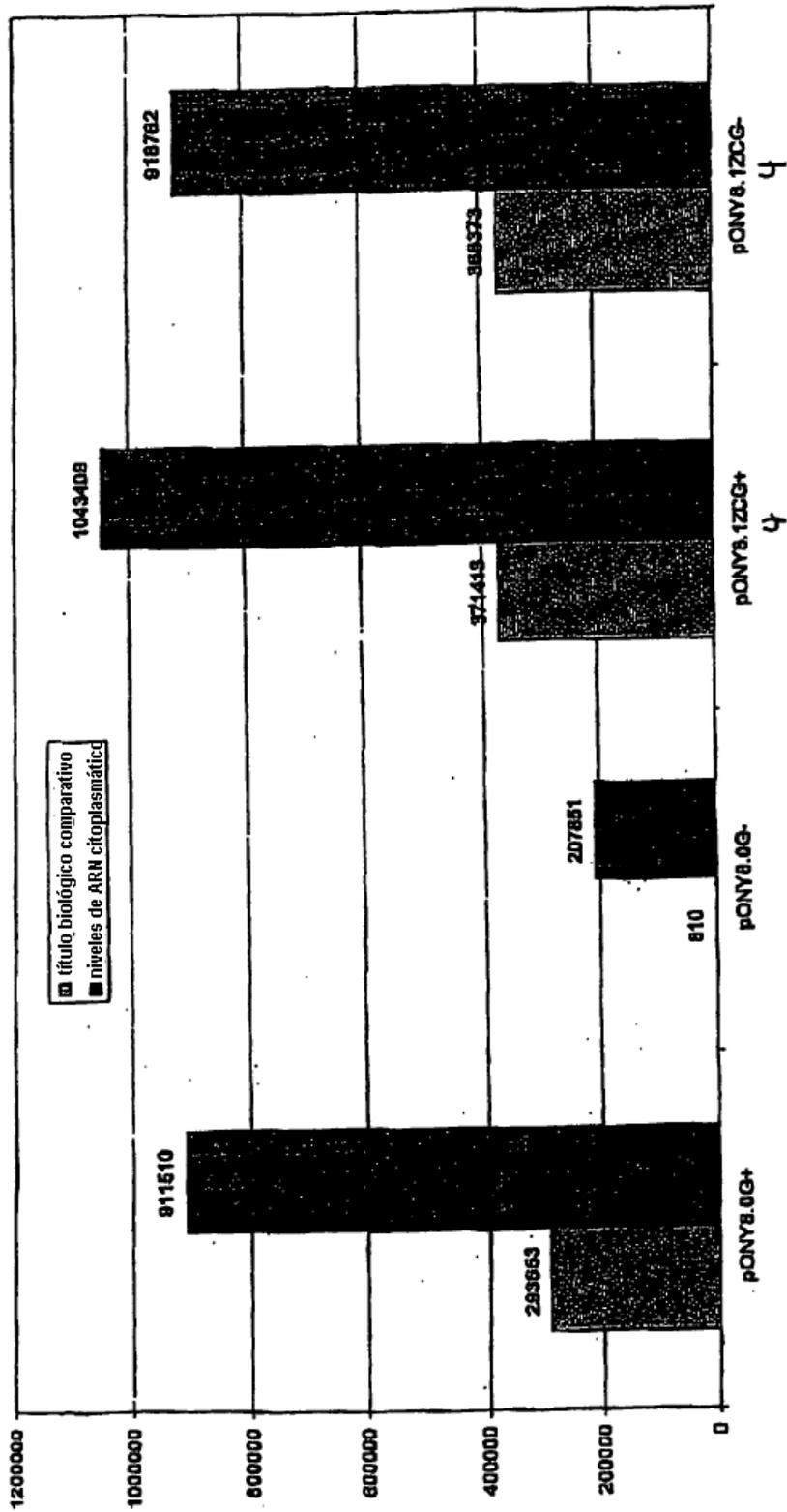


Figura 10

pONY8.4TCOG

AGATCTTGAATAATAAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTGCGC
 GACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTATTCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAA
 AAATTGATATTTGAAAATATGGCATAATTGAAAATGTGCGCGATGTGAGTTTCTGTGTAAC
 TGATATCGCCATTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCT
 TATATCGTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTC
 GCAAATAATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGG
 CGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCC
 ATTAGCCATATTATTCAATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCA
 TACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCC
 ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCA
 TAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
 GCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGTAATGGCC
 CGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCIA
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGG
 ATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTGCGTAACAACCTGCGATCGCCCGC
 CCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGG
 CCTTTGTAATAAATAAATCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTGTCTGTTCCGAGATC
 CTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTGG
 CTGATCGTAGGATCCCCGGGACAGCAGAGGAGAACTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTTCC
 TGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATTGGGAGACCCTTTGACATGGAGCAAGGGC
 CTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAATTAACTACTGGTAACTGT
 AATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTCAATTGATACCAACTTTGTAAGAAAAGGA
 CTGGCAGCTGAGGGATTGTCATCCATTGCTGGAAGATTGTAACCTCAGACGCTGTCAGGA
 CAAGAAAAGAGAGGCCCTTTGAAAGAACAATTGGTGGGCAATTTCTGCTGTAAAGATTGGGCC
 TCCAGATTAATAATTGTAGTAGATTGGAAAAGGCATCATTCCAGCTCCTAAGAGCGAAATA
 TTGAAAAGAAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAATATCTCTAGCGTC
 GACCAATTGATGTCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTT
 AATGAGTTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAACCTCGCCAGAAAGCTAGGTAGAG
 CAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATT
 GAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGGCCCTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGAT
 TTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCA
 AAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAAACCTCTGAAAATCAATTA
 GCCTTTTATGCCACAAGGTTTTTCACTAGAGAATGCATTTATGCACTCAGCGCTGTG
 GGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAA
 AGGAAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTT
 GATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCCGATTA
 GAAAAACAACCTTAAATGTGAAAGTGGGTCCGCGTACAGCGGATCCCGGGAATTCAGATCT
 TATTAAGGTACCTAACGGACCGCGGTTAACAGCTGAGCACTGGCCGGCCTAGGTGGCCG
 GTTCGAATTAGGTACCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAG
 TTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTATAGCCCATATAATGGAGTTCGCGT
 TACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGAC
 GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATG
 GGTTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
 TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACAT
 GACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
 GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATT
 TCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGAAACCAAAAATCAACGGGA
 CTTTCCAAAATGTGCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
 GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGTATAGAGATCTCCCTATCAGTGA
 TAGAGATCGTTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTACAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACG
 CTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGCGTTTAA

ACTTAAGCTTGTGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTT
 ACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGC
 GTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
 ACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTG
 CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATG
 CCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC
 CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
 GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCAC
 AACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
 GCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC
 AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCGTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGG
 ATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGCCTGCAGGAA
 TTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTTCGAATTGGAAGAGCTTTAAATCCTGGCACATCTC
 ATGTATCAATGCCTCAGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGGAACTGTGGGGTTTTTATGAG
 GGGTTTTATAAAAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAAACGCC
 ATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGG
 AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCC
 CGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAAACAGGATATCTGTGGT
 AAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCC
 TCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACC
 CTGTGCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCCTTCTGC
 TCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGGGCACTCAGATTCTGCGG
 TCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCCTTTGTAATAAATAAATCTCTACTCA
 GTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTTCGAGATCCTACAGAGCTCATGCCCTGGCGTAATCAT
 GGTCAATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAG
 CCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG
 CGTTGCGCTCAGTCCCGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAA
 TCGGCCAACCGCGGGGAGAGGGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCA
 CTGACTCGTGCCTCGGTCTGCTCGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG
 TAATACGGTTATCCACAGAA'FCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
 CCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGAC
 TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCC
 TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA
 GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC
 ACGAACCCCGTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
 ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
 CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTA
 GAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
 GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT'TTTTGTTTGAAGC
 AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT
 CTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTATGAGATTATCAAAA
 GGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
 ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGA
 TCTGTCTATTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATAC
 GGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGG
 CTCCAGATTTATCAGCAATAAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGT
 CAACTTTATCCGCC'CCATCCAGTCTAITAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT'AGTT
 CGCCAGTTAATAGTITGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCT
 CGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT
 CCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGCAAGTA
 AGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCAATTCGAGAAT
 AGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCCGCTCAATACGGGATAAATACCGCGCCAC
 ATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCA
 GGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCAC'CGTGCACCCAACTGATCTT

CAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCG
CAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAAT
ATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATAATTTGAATGTATTT
AGAAAAATAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTAAATGT
AAGCGTTAATAATTTGTAAAAATTCGCGTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAA
CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTT
GAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAA
AGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAG
TTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATT
TAGAGCTTGACGGGGAAAGCCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GACCGGC

Figura 11

pONY8.4TsynCOG/ pONY8.4TsynCOG1

AGATCTTGAATAATAAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTGCGC
 GACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTATTCGCGGATAGAGATGGCGATATTGGAA
 AAATTGATATTTGAAAATATGGCATAATTGAAAATGTGCGCGATGTGAGTTTCTGTGTAAC
 TGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCT
 TATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGAAGTTGGGGCATTCTGTGTGTC
 GCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCGGATAGAGG
 CGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCC
 ATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCA
 TACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCC
 ATGTTGACATTTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGITCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGGCTGACC
 GCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCC
 CGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGG
 ATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTGCGATCGCCCGC
 CCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGG
 CCTTTGTAATAAATAAATATAATTTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTGAGATC
 CTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTGG
 CTGATCGTAGGATCCCCGGGACAGCAGAGGAGAACTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTTT
 CTGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATTGGGAGACCCTTTGACATTGGAGCAAGGCC
 CTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAAATTAATACTACTGGTAACTGT
 AATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTCATTGATACCAACTTTGTAAGAAGAAAAGGA
 CTGGCAGCTGAGGGATTGTCATTCCATTGCTGGAAGATTGTAACCTCAGACGCTGTCAGGA
 CAAGAAAGAGAGGCCCTTTGAAAGAACATTGGTGGGCAATTTCTGCTGTAAAGATTGGGCC
 TCCAGATTAATAATTGTAGTAGATTGGAAAGGCATCATTCCAGCTCCTAAGAGCGAAATA
 TTGAAAAGAAGACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAATATCTCTAGCGTC
 GACCAATTGCCGCCACCATGAGCCGCCCTGGACAAGAGCAAAGTGATCAACTCCGCCCTGG
 AGCTGCTGAATGAGGTGCGCATCGAGGGACTGACCACGCGCAAGCTGGCCAAAAGCTGG
 GCGTGCAGACGGCCACTGTATTTGGCATGTGAAGAACAAGAGGGCCCTCCTGGACGCGC
 TCGCCATCGAAATGCTGGATCGGCACCAACCCACTTCTGTCCCTCGAAGGCGAGAGCT
 GGCAGGACTTTCTGAGAAACAACGCCAAGTCTTCCGCTGCGCCCTCCTGAGCCATCGCG
 ATGGGGCCAAGGTGCACCTGGGGACGCGCCCACTGAGAAACAGTACGAAACCCTGGAGA
 ATCAGCTGGCGTTTCTCTGCCAGCAGGGGTTCTCCCTGGAGAACGCCCTCTACGCACTCT
 CCGCCGTGGGCCACTTTACACTCGGTTGCGTGTGCTGGAGGACCAGGAGCACCAAGTCGCTA
 AGGAGGAGCGGGAGACCCCCACCACCGACTCCATGCCCCACTGCTGAGGCAGGCGATTG
 AGCTGTTCCGACCACCAGGGAGCAGAGCCTGCGTTCCTCTTCGGGCTGGAACTCATCATCT
 GCGGCCTGGAGAAGCAGCTGAAGTGCAGAGCGGCTCCGCTACAGCGGCAGCAGGGAGT
 TCCGCTCTTACTAACGGACCGCGGTTAACCAGCTGAGCACTGGCCGGCTAGGTGGCCGG
 TTCGAATTAGGTACCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGT
 TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGT
 ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACC
 TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATG
 GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGT
 ACGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATG
 ACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG
 GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATT
 CCAAGTCTCCACCCATTGACGTCATGGGAGTTTGTGTTTGGAAACCAAAATCAACGGGAC
 TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
 TGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGAT

AGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGC
 TGTITGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGCGTTTAAA
 CTTAAGCTTGTGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
 CCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCG
 TGCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA
 CCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGC
 AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGC
 CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
 GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG
 ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACA
 ACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCC
 ACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCG
 GCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
 AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCGGA
 TCACTCTCGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGCCTGCAGGAAT
 TCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAATTGGAAGAGCTTTAAATCCTGGCACATCTCA
 TGTATCAATGCCTCAGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGAACTGTGGGGTTTTTATGAGG
 GGTTTTATAAAAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA
 TTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGA
 ACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCC
 GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTA
 AGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCAGCCCT
 CAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCC
 TGTCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCCGCGCTTCTGCT
 CCCCAGCTCAATAAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGGGCACTCAGATTCTGCGGT
 CTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCCTTGTAAATAAATAAATCTCTACTCAG
 TCCCIGTCTCTAGTTTGTCTGTTCGAGATCCTACAGAGCTCATGCCCTGGCGTAATCATG
 GTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGC
 CGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC
 GTTGGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT
 CGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCAC
 TGACTCGTTCGCTCGGTTCGCTGCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
 AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCA
 GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
 CCTGACGAGCATCACAATAACGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
 ATAAAGATAACAGGCGTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCT
 GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAG
 CTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
 CGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
 CCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC
 GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAG
 AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG
 TAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCA
 GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTC
 TGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAAGATTATCAAAAAG
 GATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
 TGAGTAAACITGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGAT
 CTGTCTATTTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACG
 GGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGC
 TCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTCGC
 AACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTC
 GCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTC
 GTCGTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTTCCEAACGATCAAGGCGAGTTACATGATC
 CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAA
 GTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTAT
 GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
 GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACA

TAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAG
GATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATA
TTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA
GAAAATAAACAAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTA
AGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAC
CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
AGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAA
GGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGT
TTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGGAAAGCCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG
ACCGGC

Figura 12

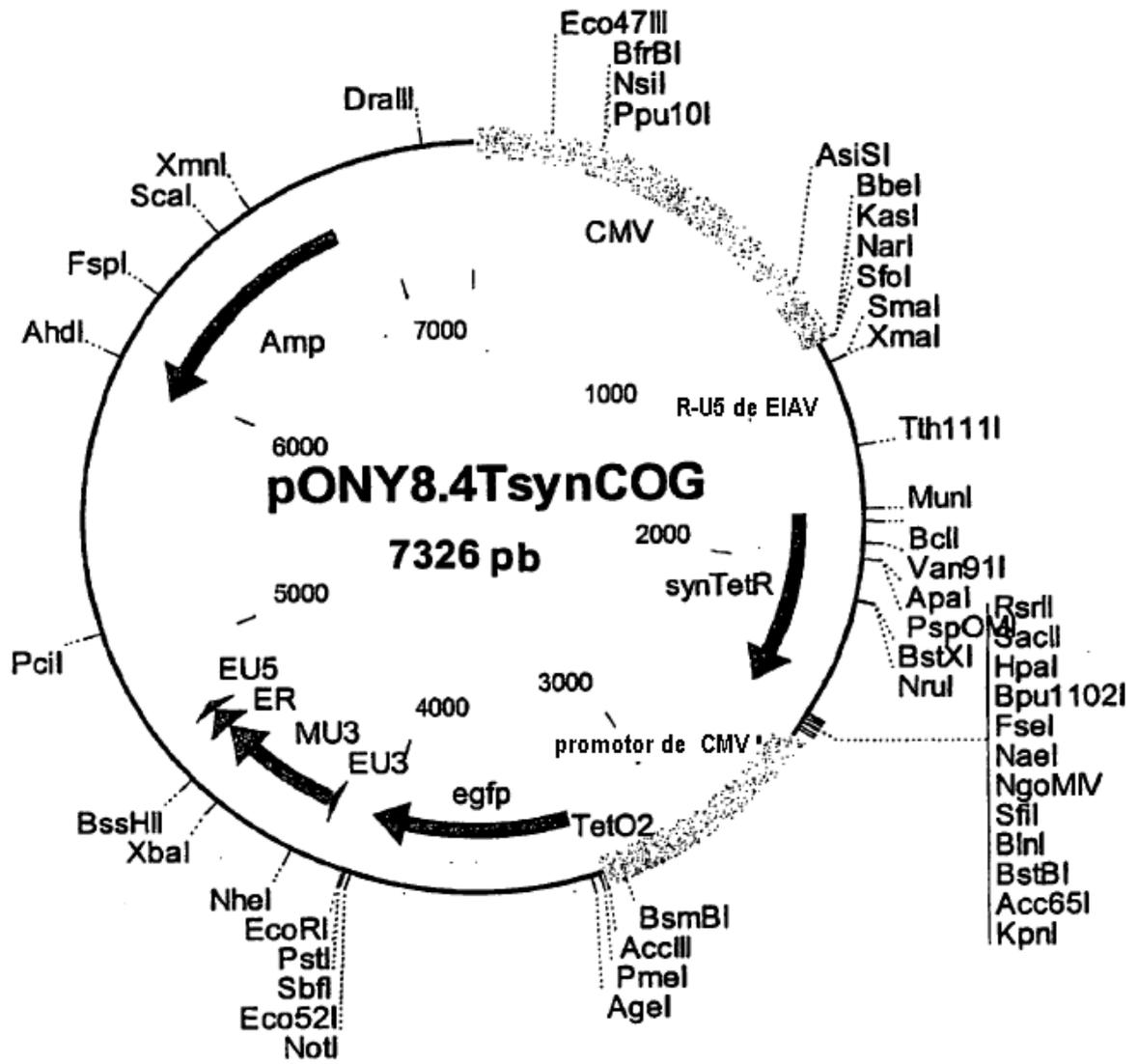


Figura 13

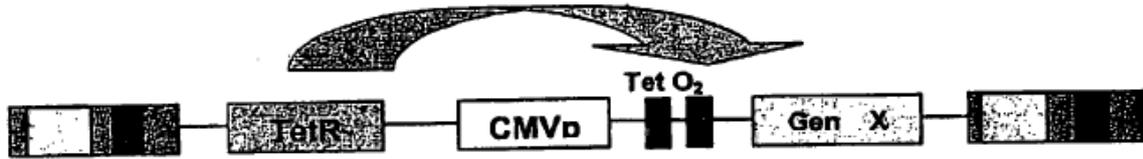
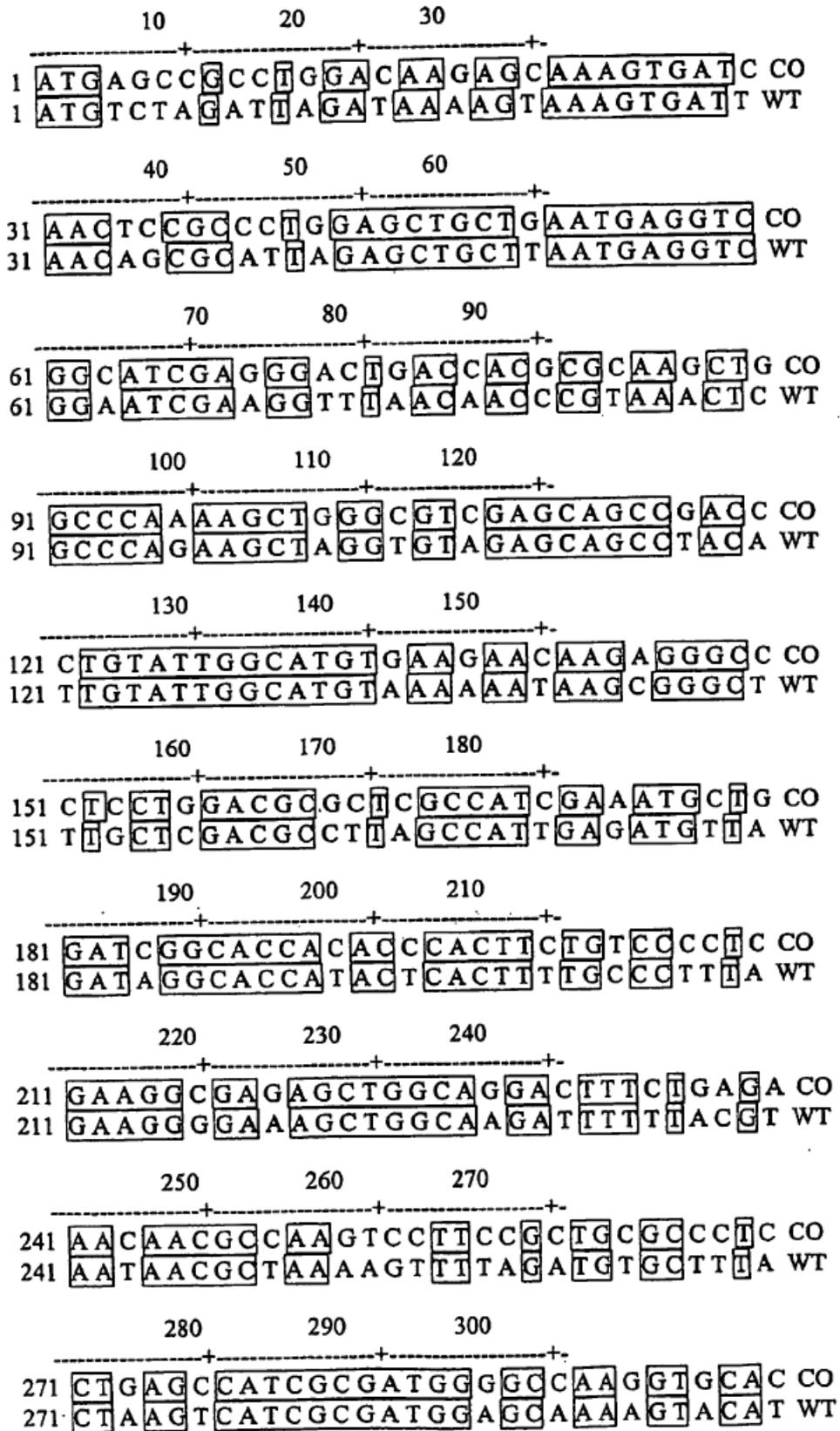


Figura 14

MH WT CO	MH WT CO	MH WT CO	MH WT CO
Ala C 53 29 59	Cys C 68 67 83	Leu C 26 12 30	Ser C 28 14 43
U 17 35 6	TG U 32 33 17	CT U 5 9 0	TC U 13 14 7
GCA 13 29 12	Gln A 12 75 17	A 3 9 0	A 5 7 0
G 17 6 24	CA G 88 25 83	G 58 3 70	G 9 0 0
Arg C 37 8 42	Glu A 25 68 18	UU A 2 55 0	AG C 34 29 50
CG U 7 17 0	GA G 75 32 81	G 6 12 0	U 10 36 0
A 6 8 0	Gly C 50 7 50	Lys A 18 83 17	Thr C 57 9 64
G 21 25 25	GG T 12 43 7	AA G 82 17 83	AC T 14 45 9
AGA 10 25 8	A 14 29 14	Pro C 48 0 57	A 14 45 9
G 18 17 25	G 24 21 29	CC T 19 57 14	G 15 0 18
Asn C 78 29 71	His C 79 33 78	A 16 29 14	Tyr C 74 20 80
AA T 22 71 29	CA T 21 67 22	G 17 14 14	TA T 26 80 20
Ile C 77 50 83	Asp C 75 13 75	Phe C 80 30 80	Val C 25 25 38
AT T 18 33 17	GA T 25 88 25	TT T 20 70 20	GT T 7 0 0
A 5 17 0			A 5 50 0

Figura 15



	310	320	330																												
301	C	T	G	GG	G	AC	G	CGG	CC	C	ACT	G	A	AAACAGTA	C	CO															
301	T	A	GG	T	ACA	CGG	CC	T	ACA	G	A	AAACAGTA	T	WT																	
	340	350	360																												
331	G	A	A	A	C	CT	G	G	A	G	A	A	T	C	A	G	C	T	G	G	C	T	T	C	C	T	C	CO			
331	G	A	A	A	T	CT	C	G	A	A	A	A	T	C	A	A	T	A	G	C	T	T	T	T	A	WT					
	370	380	390																												
361	T	G	C	C	A	G	C	A	G	G	G	T	T	C	T	C	C	CT	G	G	A	G	A	C	G	C	C	CO			
361	T	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	T	T	T	C	A	C	T	A	G	A	G	A	T	G	C	A	WT			
	400	410	420																												
391	C	T	C	T	A	C	G	C	A	C	T	C	T	C	G	C	C	G	T	G	G	G	C	C	A	C	T	T	CO		
391	T	A	T	A	T	G	C	A	C	T	C	A	G	C	G	C	T	G	T	G	G	G	G	C	A	T	T	T	WT		
	430	440	450																												
421	A	C	A	C	T	C	G	G	T	T	G	C	G	T	G	G	A	G	G	A	C	C	A	G	G	A	G	CO			
421	A	C	T	T	T	A	G	G	T	T	G	C	G	T	G	G	A	A	G	A	T	C	A	A	G	A	G	WT			
	460	470	480																												
451	C	A	C	C	A	A	G	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	G	G	A	G	C	G	G	G	A	G	A	C	CO	
451	C	A	T	C	A	A	G	T	C	G	C	T	A	A	A	G	A	A	G	A	A	G	G	G	A	A	A	C	A	WT	
	490	500	510																												
481	C	C	C	A	C	C	A	C	G	A	C	T	C	C	A	T	G	C	C	A	T	G	C	C	C	C	A	C	T	G	CO
481	C	C	T	A	C	T	A	C	T	G	A	T	A	G	T	A	T	G	C	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	WT	
	520	530	540																												
511	A	G	G	C	A	G	G	C	G	A	T	T	G	A	G	C	T	G	T	T	C	G	A	C	C	A	C	C	A	G	CO
511	C	G	A	C	A	A	G	C	T	A	T	C	G	A	A	T	A	T	T	T	G	A	T	C	A	C	C	A	A	WT	
	550	560	570																												
541	G	G	A	G	C	A	G	A	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	T	C	T	T	C	G	G	G	C	T	G	CO	
541	G	G	T	G	C	A	G	A	G	C	C	A	G	C	T	T	C	T	A	T	T	C	G	G	C	T	T	WT			

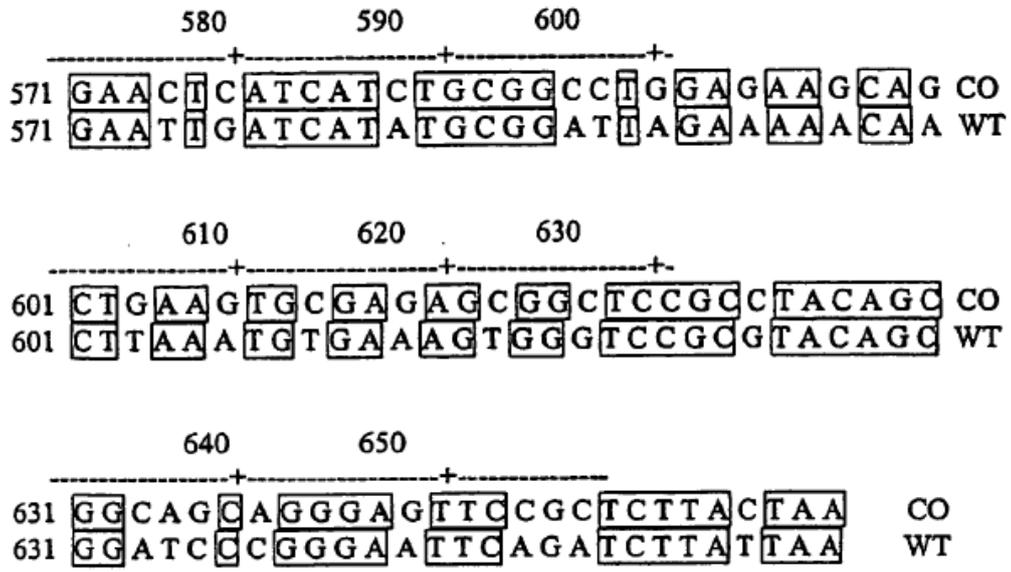


Figura 16

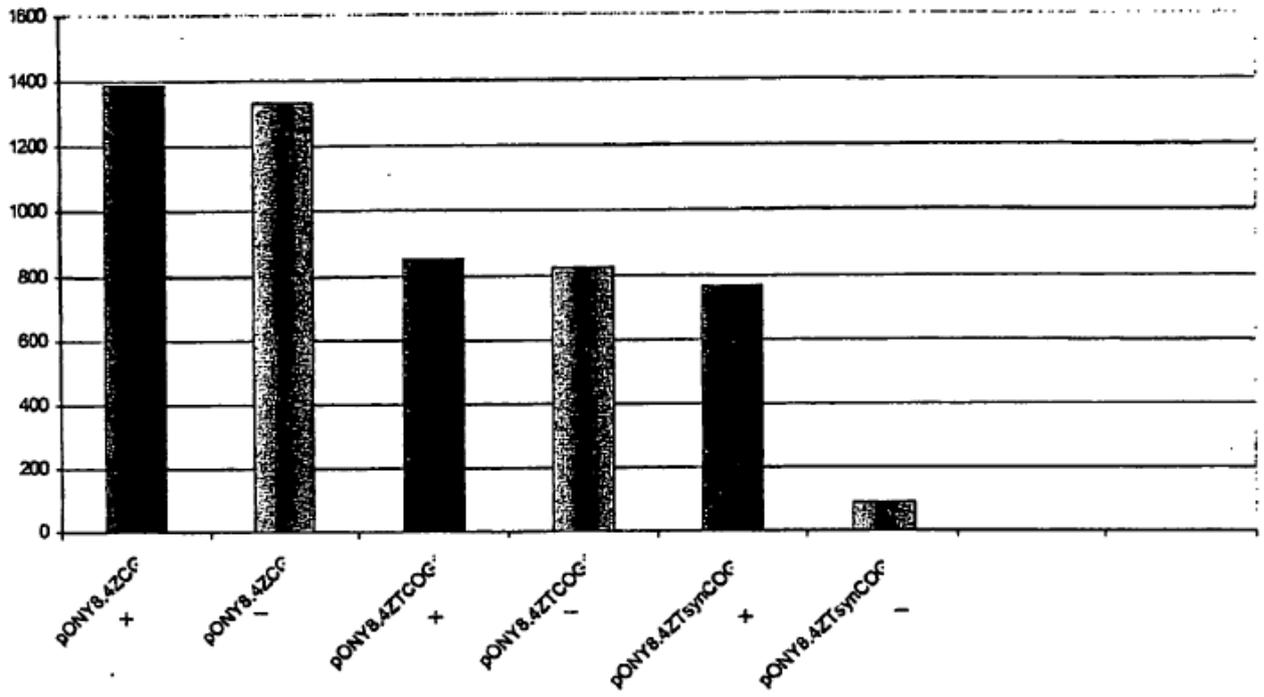


Figura 17

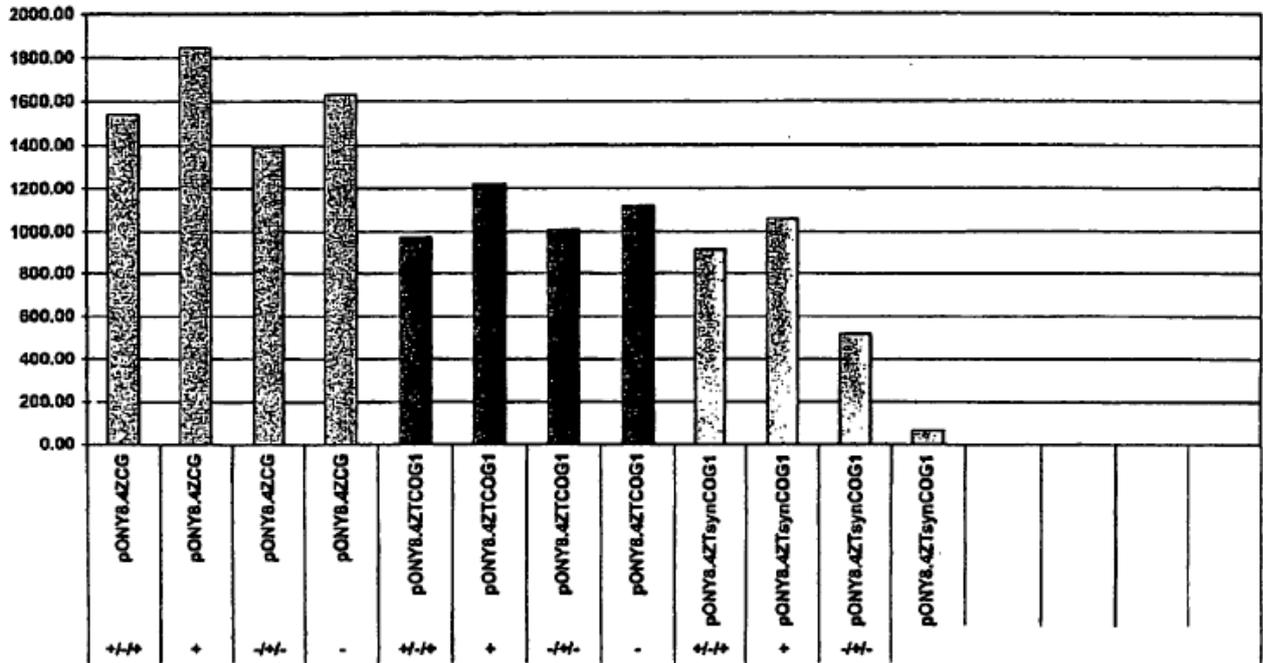


Figura 18

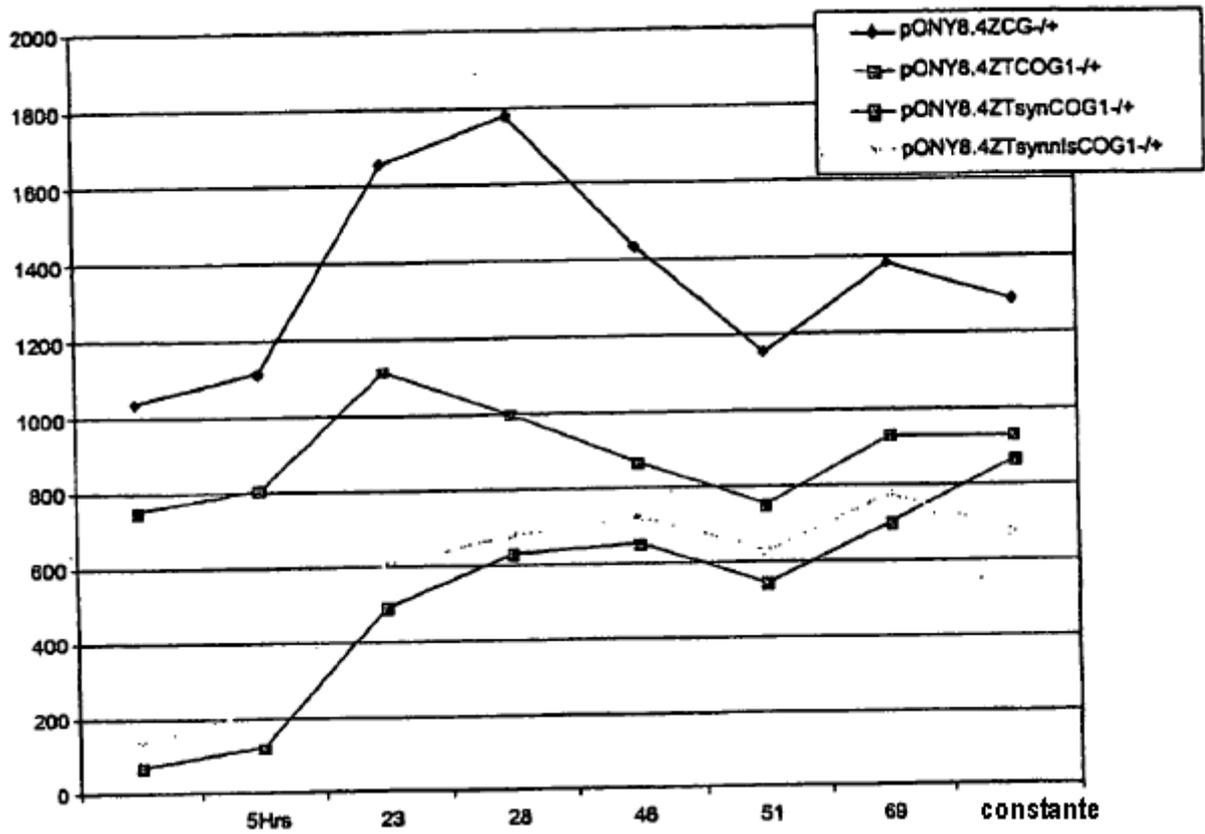


Figura 19

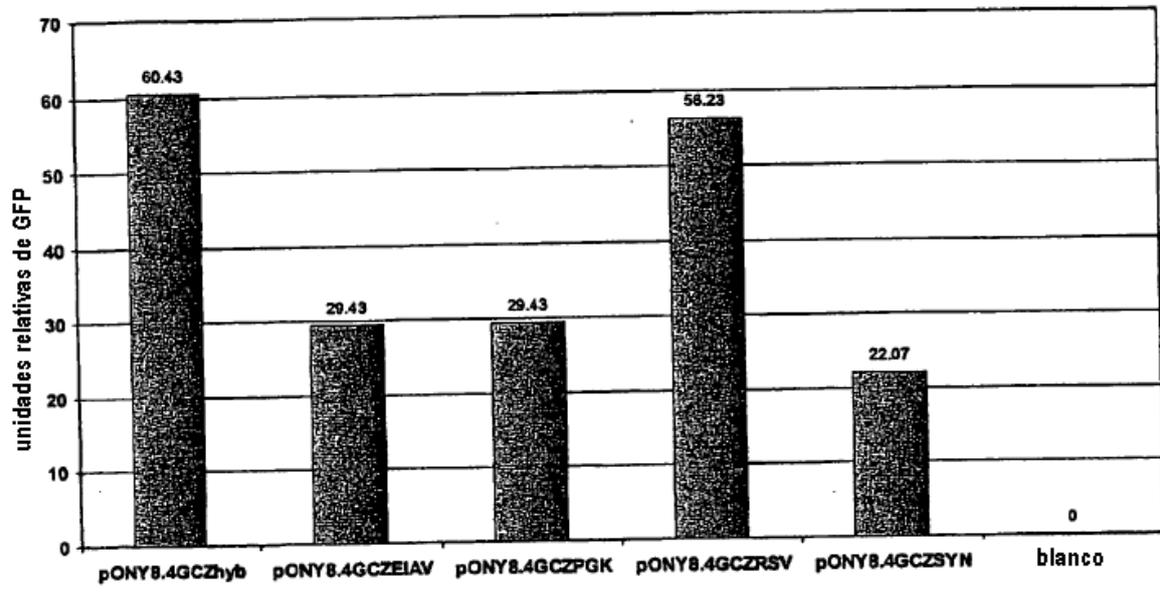


Figura 20

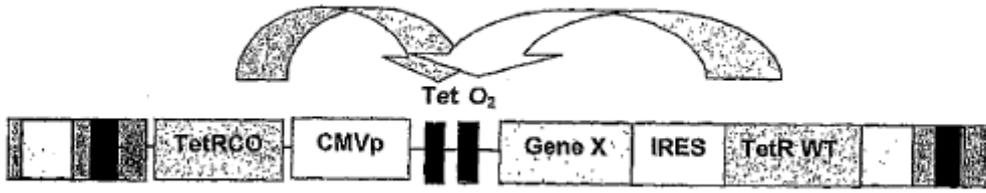


Figura 21

Virus	TÍTULO
18.1T+pONY3.1+Rev	1.29E+06
28.1T+pESYNGP+pCINeo	6.55E+03
38.1T+pESYNGP+Rev	3.42E+05
48.4NCZ+pESYNGP+Rev	4.15E+05
58.4NCZ+pESYNGP+pCINeo	2.59E+05
68.4NCT+pESYNGP+Rev	4.19E+05
78.4NCT+pESYNGP+pCINeo	1.92E+05
88.7NCT+pESYNGP+Rev	3.59E+05
98.7NCT+pESYNGP+pCINeo	4.41E+05
108.4NCT+pESYNGP+Rev	3.94E+05
118.4NCT+pESYNGP+pCINeo	2.44E+05
108.7NCZ+pESYNGP+pCINeo	1.15E+06
118.7NCZ+pESYNGP+pESYNRev	1.67E+06

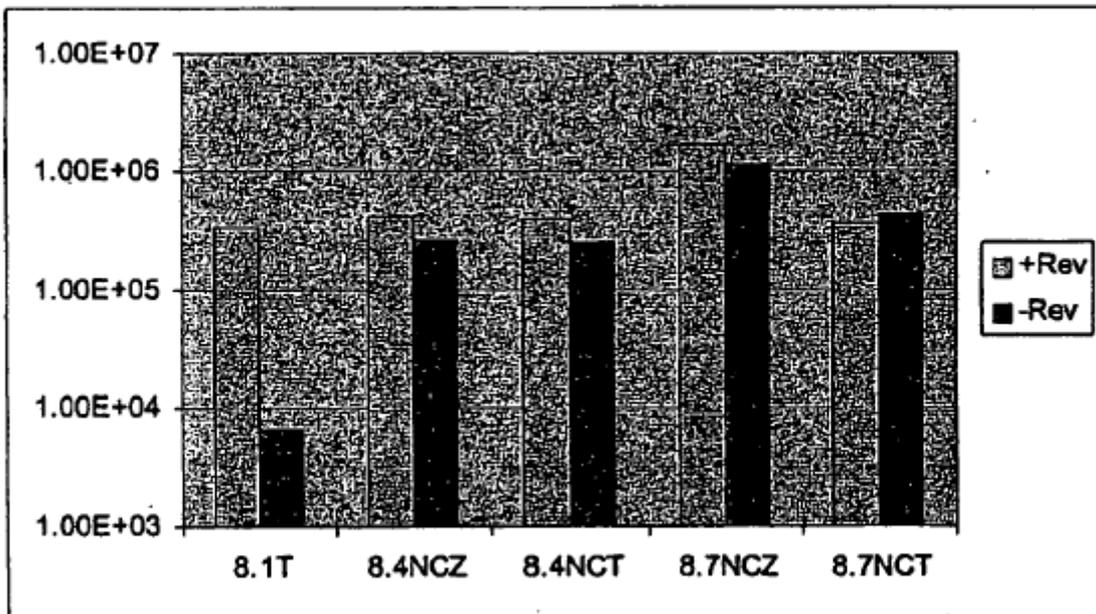


Figura 22